Beiträge zur Spezifität hormonaler Regulationsvorgänge

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

BARBARA KEIL

aus Berlin

1962

1960

7136

Beiträge zur Spezifität hormonaler Regulationsvorgänge

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

der

Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Eberhard-Karls-Universität

zu Tübingen

vorgelegt von

Barbara Keil

aus Berlin

1962

7539/62

R. UNIV
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Dekan: Professor Dr. W. von Engelhardt
1. Berichterstatter: Dozent Dr.Ing. G. Hillmann
2. Berichterstatter: Professor Dr.med. Dr.rer.nat. G. Weitzel
Tag der mündlichen Prüfung: 1.12.1960

Fotodruck: Mikrokopie G.m.b.H. München 2, Weinstr. 4

Inhaltsangabe

		Seite
Teil I:	Über protrahiert wirkende Steroidhormone	
	Einleitung	1
	Allgemeine Versuchstechnik	6
	Ergebnisse	1o
	Diskussion	26
	Zusammenfassung	3o
	Literatur	31
Teil II:	Untersuchungen über die biologische Wirkung von Steroidhormon-Derivaten mit offenem D-Ring	
	Einleitung	34
	Experimenteller Teil	39
	Ergebnisse	44
	Diskussion	48
	Zusammenfassung	49
	Literatur	5o
Teil III:	Untersuchungen über die in-vitro-Wirkungen von Thyreoidea-Hormonen und Thyreoidea-Hormon-Derivaten	
	Einleitung	51
	Experimenteller Teil	55
	Ergebnisse	6o
	Diskussion	83
	Zusammenfassung	88
	Literatur	9o

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549610_0013

Teil I

Über protrahiert wirkende Steroidhormone

Einleitung

Die reine Kastrationstechnik an Mensch und Tier war schon seit Jahrtausenden bekannt, wenig Klarheit dagegen bestand früher über die Art der Wirkungsweise der Gonaden auf die Ausbildung der sekundären Geschlechtsmerkmale.

Die ersten systematischen Versuche, die jedoch in Vergessenheit gerieten, führte Berthold (4) durch, der im Jahre 1849 eine Testistransplantation auf einen kastrierten Hahn vornahm, nach der die Kastrationsmerkmale verschwanden. Später wurde versucht, durch Extraktion von Testes, Ovarien und Harn Substanzen mit Hormonwirksamkeit zu isolieren.

Die von Allen und Doisy (1) 1923 beschriebene quantitative Bestimmungsmethode des weiblichen Sexualhormons unter Ausnutzung des Vaginalabstrichs von Ratten oder Mäusen ermöglichte fast gleichzeitig Butenandt (8) und Doisy 1929 die Isolierung von Östron, des ersten chemisch identifizierten Steroidhormons. 1933 wurde dann von Schwenk und Hildebrand (76) das bedeutend wirksamere Östradiol dargestellt.

Der Forscherkreis um Koch (27) arbeitete Methoden zur Gewinnung stark androgen wirkender Harnextrakte aus, Butenandt und seine Mitarbeiter (9) isolierten aus dem Harn den ersten männlichen Wirkstoff, das Androsteron, dessen Synthese Ruzicka (7o) im Jahre 1934 gelang. Ein Jahr später konnten Laqueur und seine Mitarbeiter (16) ein zweites männliches Sexualhormon, das Testosteron, isolieren, dessen androgene Wirksamkeit erheblich größer als die des Androsterons ist.

Es wurde nun festgestellt (16, 17, 58-6o, 67, 68), daß ungereinigte Hodenextrakte eine stärkere androgene Wirksamkeit entfalten als das reine Testosteron. Miescher, Wettstein und Tschopp (58) isolierten aus einer aktivierenden Säurefraktion Palmitinsäure als wirksame Substanz, auch weitere gesättigte und ungesättigte Fettsäuren zeigen gewisse Aktivatorei-

genschaften. Durch Veresterung läßt sich die Wirksamkeit der Steroidhormone bedeutend verstärken, wie schon seit längerer Zeit bekannt ist (8, 1o, 17, 34, 35, 54, 56-59, 62, 66, 71, 72, 74, 75). Besonders Miescher und seine Mitarbeiter stellten eine große Anzahl von Estern der Steroidhormone her und fanden bei den Östrogenen Östradiol-3-benzoat, -17-propionat, -3-acetat-17-propionat und -3,17-dipropionat, bei den Androgenen Testosteron-17-propionat und -3-acetat-17-butyrat am wirksamsten. Eine starke Verlängerung der Wirksamkeit weist das Testosteron-cyclopentylpropionat auf (73). Die Veresterung des Testosterons mit halogenierten Fettsäuren und Aminosäuren (56) oder Alkoxy- und Alkylmerkaptosäuren (62) brachte keine Vorteile.

In der Klinik hat sich außerdem die Verwendung von Kristallsuspensionen eingebürgert, die als zweckmäßig erkannt wurde (18, 24, 29, 3o, 52, 53, 55, 81). Noch bessere Erfolge werden durch die subkutane oder intramuskuläre Implantation von Steroidhormon-Tabletten erreicht (5, 6, 18, 19, 22, 25, 26, 3o, 75). Weiterhin läßt sich eine Steigerung der Hormonwirksamkeit erreichen, wenn man die Niederschläge, die durch Verdünnen der Lösungen der Hormone in organischen Lösungsmitteln mit Wasser entstehen, an Aluminium-Phosphat adsorbiert (12, 24, 52, 81). Dieses Prinzip wird allerdings noch kaum ausgewertet.

Zahlreiche Untersuchungen beschäftigten sich mit den Folgen der Kastration, die von Marshall und Parkes (51, 65) ausführlich beschrieben wurden, und den physiologischen Wirkungen der Sexualhormone.
Besonders wichtig sind die Veränderungen der Vaginalschleimhaut bei Ratten- und Mäuseweibchen, die parallel mit den sich im Ovarium abspielenden Vorgängen verlaufen, wie sie Allen und Doisy und Mitarbeiter (1-3, 36) untersuchten. Bei normalen Rattenweibchen finden sich im Ruhezustand des Ovariums - dem Di-Östrus - nur etwas Schleim, einige Leukozyten und Epi-

thelzellen im Vaginalabstrich. Im Verlauf des Follikelwachstums schwellen Uterus- und Vaginalschleimhaut an, im Abstrich sind reichlich Epithelzellen mit deutlich sichtbarem Kern und wenige Leukozyten zu erkennen, dieses Stadium wird als Prä-Östrus bezeichnet. Zur Zeit des Follikelsprungs - Östrus - verhornen die in mehreren Lagen angeordneten Epithelzellen der Vagina, wobei die obersten Schichten abgestoßen werden und als kernlose "Schollen" das Bild im Abstrich vollkommen beherrschen. Während im Ovarium das Corpus luteum entstanden ist, erscheinen im Abstrich nun Schleim und größere Zahlen von Leukozyten, Epithelzellen und Schollen treten dagegen zurück - Met-Östrus. Nach der Rückbildung des Corpus luteum gelangen Uterus und Vagina wieder in den Zustand des Di-Östrus, und anschließend beginnt der Zyklus von neuem.
Ovariektomie wandelt die großen und gut durchbluteten Tuben, Uterus, Cervix und Vagina in dünne, anämische Organe um, der Vaginalabstrich zeigt dauernd das Bild des Di-Östrus. Nach Injektion von Östrogenen tritt wieder Östrus auf, der als Maß der Wirksamkeit verwendet werden kann.
Der Uterus kastrierter Rattenweibchen ändert sein Gewicht unter dem Einfluß von östrogenen Stoffen (57). Man findet Hyperämie und Schleimsekretion, der dann weiter die charakteristische Hypertrophie von Endometrium und Myometrium folgt (7, 83). An den Gewichtsänderungen des Uterus der Ratte, ebenso der Maus (23), läßt sich die Wirksamkeit injizierter Östrogene gut feststellen.

Auf die Kastration männlicher Ratten folgt eine starke Atrophie der akzessorischen Geschlechtsorgane, wobei Samenblasen und Prostata eine erhebliche Gewichtsabnahme zeigen. Auch der Penis atrophiert, doch ist sein Gewichtsverlust geringer als der der drüsigen Organe (42). Nach der Kastration bildet sich das Drüsenepithel von Samenblasen und Prostata zurück, während sich das zwischen den Drüsengängen liegende Bindegewebe relativ vermehrt (61).

Durch subkutane Injektionen von hormonhaltigen Extrakten (11, 38, 4o, 41, 45, 61), weiterhin auch durch Verabreichung von Androsteron (11, 46), Testosteron (43) oder Testosteron-Estern (44, 54, 59, 73) können die Ausfallserscheinungen nach der Kastration aufgehoben oder wenigstens verringert werden. Aus den Gewichtsveränderungen von Samenblasen und Prostata und durch histologische Untersuchungen dieser Organe lassen sich Aussagen über die androgene Wirksamkeit von Hormonpräparaten machen.

Auch zwischen den übrigen Körperorganen und dem Ausfall oder der Zufuhr an Sexualhormonen bestehen Beziehungen.
Es wurde z.B. festgestellt (13, 39, 42), daß der Thymus normaler männlicher und weiblicher Ratten vor Eintritt der Geschlechtsreife am stärksten entwickelt ist, später jedoch zurückgebildet wird. Bei Kastraten findet diese Rückbildung nicht statt, das Thymusgewicht steigt also langsam an. Werden kastrierte Ratten mit androgenen oder östrogenen Hormonen behandelt (13, 28, 33, 41, 43-48), dann stellen sich Rückbildungserscheinungen ein, die denen normaler Tiere ähnlich sind.

Nach Verabreichung von Sexualhormonen treten Veränderungen an den Nieren auf, die Gegenstand eingehender Untersuchungen von Korenchevsky und seinen Mitarbeitern, Selye (79, 8o) und Kochakian (37) waren. Es wurden die Erscheinungen studiert, die sich nach der Kastration männlicher Ratten (42, 49) und anschließender Behandlung mit gereinigten, androgenen Extrakten (41, 45), Androsteron (46), Testosteron (11) und Testosteron-propionat (44) einstellen. Nach der Kastration tritt eine langsame aber stetige Abnahme des Nierengewichtes ein (37, 5o), durch Zufuhr von androgenen Hormonen ist es möglich, die normale Größe dieses Organs wiederherzustellen. Im Gegensatz dazu verkleinert die Zufuhr von östrogenen Hormonen das Nierengewicht bei Rattenweibchen (28, 33, 43, 46, 47).

Das Gewicht des Herzens weiblicher Ratten nimmt nach der Kastration ab

und kann durch Zufuhr von östrogenen Stoffen wieder vergrößert werden (28, 33, 48).

Auch die Milz reagiert auf Ausfall der Sexualhormone (28, 33, 41, 42, 44, 46, 47). Nach der Kastration tritt eine Reduktion des Milzgewichtes auf, die durch Injektion von androgenen oder östrogenen Substanzen teilweise rückgängig gemacht werden kann.

Zwischen der Funktion der Nebennierenrinde und dem Gewicht des Thymus bestehen enge Beziehungen. Selye fand (77, 78), daß auf verschiedene Formen der Stimulierung intakter Ratten eine Nebennierenrinden-Hypertrophie ebenso wie eine Thymusatrophie folgt.
Die Verabreichung von ACTH an normale Tiere führt zu einer Thymusatrophie, wobei gleichzeitig Lymphopenie beobachtet wird (21), die gleichen Wirkungen haben auch Corticosteron (82) und, schwächer ausgeprägt, Progesteron (14), während Desoxycorticosteron unwirksam ist.
Bei adrenalektomierten Tieren wird Thymushyperplasie beobachtet, die durch Gaben von Cortison rückgängig gemacht werden kann (31,32). ACTH wirkt in diesem Falle nicht (15), beeinflußt also das Thymusgewicht nur durch Vermittlung der Nebennierenrinde. Die nach Nebennierenexstirpation beobachtete Thymushypertrophie kann durch Kochsalzgaben nicht kompensiert werden (69).

Aufgrund der oben angegebenen Befunde erschien es aussichtsreich, verschiedene Ester des Östradiols, des Testosterons und des Cortisons an der Ratte mit den oben erwähnten Tests auf ihre Wirkungsdauer und -intensität zu prüfen, wobei gleichzeitig die Gewichtsänderungen an weiteren Körperorganen untersucht werden sollten.

Allgemeine Versuchstechnik

A. Östradiol-Ester

Rattenweibchen im Gewicht von loo bis 13o g wurden unter Äthernarkose kastriert. Eine Gruppe von Tieren erhielt 7 Tage nach der Kastration eine einmalige Injektion von 0,1 ml Sesamöl subkutan, worin die jeweils verabreichte Östradiol-Ester-Menge gelöst war - Einzelheiten siehe Tabelle 2. Weitere Gruppen von Tieren wurden vom 8. Tage nach der Kastration an täglich mit loo, lo, 4 bzw. 1 γ freiem Östradiol, gelöst in 0,1 ml Sesamöl, subkutan gespritzt, während eine letzte Gruppe als unbehandelte kastrierte Kontrolltiere verblieb - Tabelle 1.

Nach bestimmten Zeitabständen - Einzelheiten siehe Tabellen 1 und 2 - wurden sämtliche Tiere gewogen und einige - meist 5 - durch Chloroforminhalation getötet. Es wurden Uterus, Thymus, Herz, Milz und Nieren herauspräpariert, von anhaftendem Bindegewebe befreit und sofort auf einer Torsionswaage gewogen. Die so erhaltenen Organgewichte wurden auf loo g Rattengewicht umgerechnet, alle weiter unten aufgeführten Angaben beziehen sich also stets auf loo g Rattengewicht und stellen einen Durchschnitt aus mehreren - meist 5 - Tieren dar.

Durch häufige Vaginalabstriche, die durch Carbolfuchsin gefärbt wurden, wurde die Östrusdauer kontrolliert.

In den folgenden Tabellen sind die untersuchten Substanzen, ihre Dosierung und die Beobachtungsintervalle angegeben.

Tabelle 1: Tägliche Verabreichung von freiem Östradiol

Dosis in γ	getötet jeweils 5 Tiere
loo	im Abstand von 5 bzw. lo Tagen
lo	im Abstand von 5 bzw. lo Tagen
4	im Abstand von lo Tagen
1	im Abstand von lo Tagen

Tabelle 2: Verzeichnis der untersuchten Östradiol-Ester, ihre Dosierung und die Beobachtungsintervalle

Substanz	einmalige Dosis in γ	getötet jeweils 5 Tiere
Östradiol-17β-butyrat	1000	1 x wöchentlich
	100	1 x wöchentlich
	10	1 x wöchentlich
	1	1 x wöchentlich
" -valerianat	1000	1 x wöchentlich
	100	1 x wöchentlich
	10	1 x wöchentlich
	1	1 x wöchentlich
" -capronat	1000	1 x wöchentlich
	100	1 x wöchentlich
	10	2 x wöchentlich
	1	3 x wöchentlich
" -önanthat	1000	1 x wöchentlich
	100	1 x wöchentlich
	10	1 x wöchentlich
	1	1 x wöchentlich
" -caprylat	1000	1 x wöchentlich
	100	1 x wöchentlich
	10	2 x wöchentlich
	1	3 x wöchentlich
" -undecylat	1000	1 x wöchentlich
	100	1 x wöchentlich
	10	2 x wöchentlich
	1	3 x wöchentlich
" 3-benzoat	1000	1 x wöchentlich
	100	1 x wöchentlich
	10	1 x wöchentlich
	1	2 x wöchentlich
Unbehandelte Kastraten	-	1 x wöchentlich

B. Testosteron-Ester

Männliche Ratten im Gewicht von 6o bis 8o g, das entspricht einem Alter von ungefähr 5o Tagen, wurden unter Äthernarkose kastriert. 7 Tage nach der Kastration erhielten die Tiere eine subkutane Injektion von 0,4 ml Sesamöl, worin jeweils 2o mg Substanz gelöst waren.
Unbehandelte kastrierte und nichtkastrierte Rattenmännchen wurden als Kontrollen benutzt.
Im Abstand von jeweils einer Woche, das erste Mal am 8. Tage nach der Injektion, wurden sämtliche Tiere der Gruppe gewogen und einige - meist 5 - durch Chloroform getötet. Wie oben angegeben, wurden die gefüllten Samenblasen, Prostata mit Koagulationsdrüsen, sowie Nieren, Thymus und Milz herauspräpariert, gewogen und die Organgewichte auf loo g Ratte umgerechnet.

Tabelle 3: Verzeichnis der geprüften Testosteron-Ester

Testosteron-acetat	
" -propionat	
" -butyrat	wöchentlich
" -valerianat	5 Tiere
" -capronat	getötet
" -önanthat	
" -caprylat	
" -diacetat	

C. Cortison-Ester

Infantile männliche Ratten im Gewicht von ca. 3o g, also ca. 5 Wochen alt, erhielten eine einmalige subkutane Injektion von 0,8 ml Sesamöl, die die gewünschte Cortison-Ester-Menge enthielt. Es wurden Cortison-acetat und -önanthat in Mengen von 8, 4, 2 und 1 mg injiziert, einige Tiere bekamen reines Sesamöl. Die Tiere wurden nach 1, 2, 4 und 8 Tagen gewogen und durch Chloroform getötet. Thymus, Herz, Milz, Nieren, Hoden, Samen-

blasen, Prostata und Nebennieren wurden herauspräpariert und gewogen. Die erhaltenen Organgewichte wurden auf loo g Ratte umgerechnet. Alle angegebenen Organgewichte sind Mittelwerte aus meist 5 Tieren.

Ergebnisse

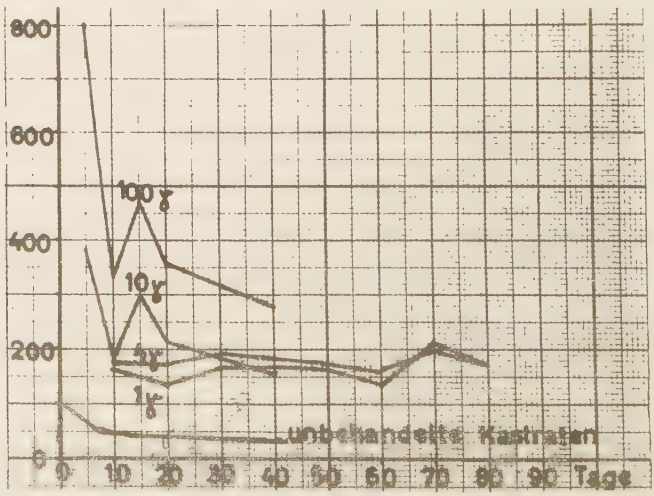
A. Östradiol-Ester

Die Zufuhr von Östradiol oder seinen Estern beeinflußt das Uteruswachstum kastrierter Rattenweibchen. Während das Gewicht des Uterus unbehandelter Kastraten nur noch 4o bis 5o mg je loo g Ratten beträgt, läßt sich durch tägliche Verabreichung von freiem Östradiol der Gewichtsabfall, der die Rückbildung des Uterus sichtbar macht, verhindern. In den ersten 5 Tagen wird eine äußerst starke Sekretbildung des Uterus beobachtet, besonders bei den mit täglich loo und lo γ behandelten Tieren, innerhalb der nächsten Tage nehmen die Gewichte ab, siehe die folgende Tabelle und die Abbildung 1.

Tabelle 4: Uterusgewichte (mg/loo g Ratte) kastrierter Ratten nach täglicher Verabreichung von freiem Östradiol

tägliche Dosis	0	5	lo	15	2o	3o	4o	5o	6o	7o	8o
						Tage nach Kastration					
loo γ	–	796	335	477	356	–	279	–	–	–	–
lo γ	–	387	18o	299	213	–	158	–	–	–	–
4 γ	–	–	178	–	173	192	187	175	159	198	169
1 γ	–	–	161	–	135	163	17o	163	137	2o6	171
unbehand. Kastraten	lol	51	–	43	–	41	33	–	–	–	–

Abbildung 1: Wirksamkeit von täglich verabreichtem Östradiol – in Dosen von loo, lo, 4 und 1 γ – auf das Uterusgewicht (mg/loo g Ratte) kastrierter Rattenweibchen



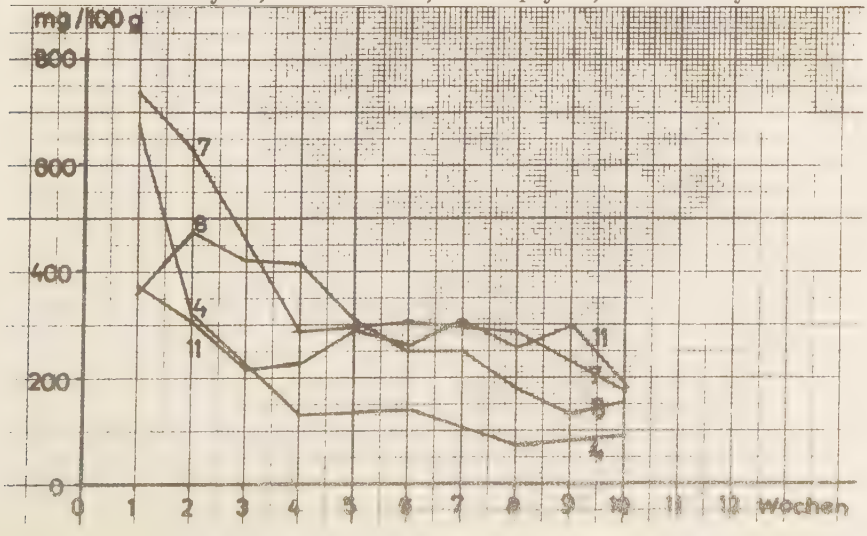
Die einmalige Gabe von Östradiol-Estern vermag ebenfalls die Rückbildung zum Kastratenuterus aufzuhalten. Die untersuchten Ester: Östradiol-butyrat, -valerianat, -capronat, -önanthat, -caprylat, -undecylat und im Vergleich dazu -benzoat zeigen starke Unterschiede in der Wirkung, die im einzelnen erläutert werden sollen, siehe die folgende Tabelle.

Tabelle 5: Uterusgewichte (mg/100 g Ratte) kastrierter Ratten, die einmal 1000 γ Östradiol-Ester erhielten

Substanz	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
									Wochen nach Injektion			
Butyrat	673	321	–	131	–	138	–	72	–	92	–	–
Valerianat	600	499	–	366	–	157	–	164	–	145	–	74
Capronat	533	400	283	187	225	179	166	188	139	139	174	–
Önanthat	733	625	–	290	–	307	–	287	–	177	–	–
Caprylat	359	476	420	414	303	251	251	178	133	153	–	–
Undecylat	371	312	221	229	294	257	306	253	295	176	–	–
Benzoat	817	350	–	200	–	106	–	–	–	–	–	–

Der einmaligen Injektion von 1000 γ Substanz folgt eine starke Entwicklung des Uterus, die von der Bildung erheblicher Mengen Sekret begleitet wird. Von der 2. Woche nach der Injektion ab wird die Sekretbildung beträchtlich vermindert, die Rückbildung des Uterus bis zum Kastratenstadium geht im weiteren Verlauf mehr oder weniger schnell vonstatten.

Abbildung 2: Uterusgewichte (mg/100 g Ratte) kastrierter Rattenweibchen nach einmaliger Injektion von 1000 γ Östradiol-Ester
4 = Butyrat, 7 = Önanthat, 8 = Caprylat, 11 = Undecylat



Nach der einmaligen Injektion von loo γ Östradiol-Ester an kastrierte Rattenweibchen wurden folgende Uterusgewichte gefunden.

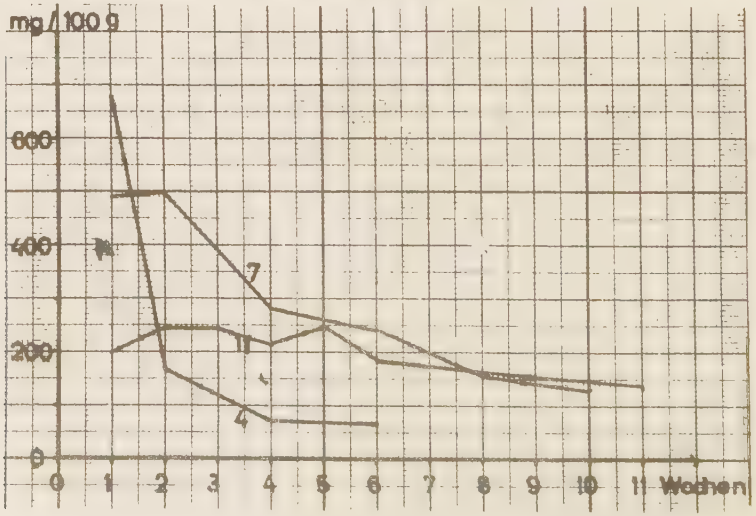
Tabelle 6: Uterusgewichte (mg/loo g Ratte) kastrierter Ratten, die einmal loo γ Östradiol-Ester erhielten

Substanz	1	2	3	4	5	6	7	8	9	lo	11 Wochen nach Inj.
Butyrat	673	17o	-	7o	-	67	-	-	-	-	-
Valerianat	542	25o	-	227	-	133	-	lo2	-	-	-
Capronat	337	177	149	151	171	116	lo7	82	-	-	-
Önanthat	489	495	-	28o	-	24o	-	156	-	13o	-
Caprylat	317	266	243	189	181	17o	-	127	-	-	-
Undecylat	198	243	242	215	246	182	-	-	143	-	135
Benzoat	281	125	-	76	-	-	-	-	-	-	-

Nach der Injektion von einmal loo γ Östradiol-Ester wird ebenfalls eine größere Sekretbildung des stark entwickelten Uterus beobachtet. Östradiol-benzoat und -butyrat weisen eine nur kurz dauernde Wirkung auf, während die restlichen Ester die Ausbildung des Kastratenuterus wenigstens 6 bis 7 Wochen lang verhindern.

Die Abbildung 3 zeigt die Wirkungsunterschiede einiger Ester auf das Uterusgewicht kastrierter Ratten.

Abbildung 3: Uterusgewichte (mg/loo g Ratte) kastrierter Rattenweibchen nach einmaliger Injektion von loo γ Östradiol-Ester
4 = Butyrat, 7 = Önanthat, 11 = Undecylat



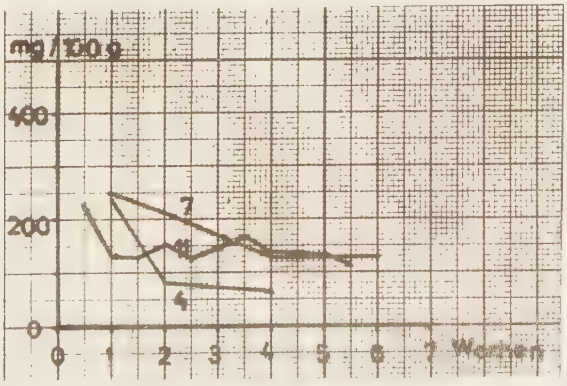
Die nach der einmaligen Injektion von lo γ Östradiol-Ester an kastrierte Rattenweibchen gefundenen Uterusgewichte sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

Tabelle 7: Uterusgewichte (mg/loo g Ratte) kastrierter Ratten, die einmal lo γ Östradiol-Ester erhielten

Substanz	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5	5,5	6 Wochen nach Inj.
Butyrat	-	237	-	8o	-	-	-	62	-	-	-	-
Valerianat	-	245	-	149	-	-	-	14o	-	-	-	65
Capronat	329	18o	148	14o	99	116	92	89	76	7o	65	-
Önanthat	-	246	-	21o	-	-	-	123	-	-	-	125
Caprylat	372	196	166	172	137	143	167	135	116	1o5	94	-
Undecylat	228	132	129	152	125	142	161	129	132	129	111	-
Benzoat	-	112	-	9o	-	8o	-	-	-	-	-	-

Auch die Verabreichung von einmal lo γ Östradiol-Ester regt die Sekretbildung des Uterus an, die Veränderungen zum Kastratenuterus werden von den Estern mit höheren Fettsäuren mehrere Wochen lang verzögert.
In der Abbildung 4 sind die Wirkungsunterschiede von Östradiol-butyrat, -önanthat und -undecylat deutlich sichtbar.

Abbildung 4: Uterusgewichte (mg/loo g Ratte) kastrierter Rattenweibchen nach einmaliger Injektion von lo γ Östradiol-Ester
4 = Butyrat, 7 = Önanthat, 11 = Undecylat



Eine kurzfristige Entwicklung des Uterus kastrierter Rattenweibchen tritt nach der Injektion von einmal 1 γ Östradiol-benzoat, -butyrat, -valerianat, -capronat, -önanthat und -caprylat auf, -undecylat übt in dieser Dosierung auf das Gewicht keinen Einfluß mehr aus, wie die folgende Tabelle zeigt.

Tabelle 8: Uterusgewichte (mg/loo g Ratte) kastrierter Ratten, die einmal 1 γ Östradiol-Ester erhielten

Substanz	2	4	6	7	8	lo	14 Tage nach Inj.
Butyrat	-	-	-	136	-	-	65
Valerianat	-	-	-	155	-	-	82
Capronat	165	134	122	-	131	76	-
Önanthat	-	-	-	157	-	-	lo2
Caprylat	81	lo5	74	-	73	81	-
Undecylat	63	58	47	-	64	74	-
Benzoat	-	149	-	111	-	84	79

Die Dauer des nach Injektion von Östradiol-Verbindungen auftretenden Östrus ist wie das Uteruswachstum von der Art und Dosis des jeweiligen Esters abhängig. Als Dauer des Östrus wurde die Anzahl von Tagen angesehen, an denen bei wenigstens der Hälfte aller injizierten Tiere Schollen im Vaginalabstrich zu finden waren.

Die Injektion von 1 γ Östradiol-Ester löst nicht mehr bei allen untersuchten Tieren Östrus aus. Wie die folgende Tabelle zeigt, ist die Östrusdauer nach Zufuhr von 1 γ beimÖnanthat am längsten und nimmt dann ab, beim Undecylat tritt überhaupt kein Östrus auf.

Tabelle 9: Östrusdauer nach Verabreichung von 1 γ Östradiol-Ester

Substanz	Östrusdauer in Tagen
Östradiol-butyrat	7
" -valerianat	7
" -capronat	6
" -önanthat	9
" -caprylat	5
" -undecylat	0
" -benzoat	3

Nach der Injektion von einmal lo γ Östradiol-Ester treten deutliche Unterschiede in der Wirksamkeit der einzelnen Ester hervor. Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die Dauer des Östrus.

Tabelle lo: Östrusdauer nach Verabreichung von lo γ Östradiol-Ester

Substanz	Östrusdauer in Tagen
Östradiol-butyrat	lo
" -valerianat	17
" -capronat	18
" -önanthat	mehr als 4o
" -caprylat	32
" -undecylat	mehr als 35
" -benzoat	7

Es ergibt sich also, daß in dieser Dosierung das mit einer längeren Fettsäure veresterte Östradiol den Östrus bedeutend länger aufrecht erhält.

Diese unterschiedlichen Wirkungen der Östradiol-Ester finden sich in der Verabreichung von loo γ noch besser ausgeprägt, die in der folgenden Tabelle zusammengestellte Östrusdauer der einzelnen Ester läßt sie gut erkennen.

Tabelle 11: Östrusdauer nach Verabreichung von loo γ Östradiol-Ester

Substanz	Östrusdauer in Tagen
Östradiol-butyrat	17
" -valerianat	37
" -capronat	33
" -önanthat	mehr als 7o
" -caprylat	53
" -undecylat	mehr als 7o
" -benzoat	lo

Östradiol-benzoat ruft in dieser Dosierung nur kurzen Östrus hervor, wohingegen -caprylat und hauptsächlich -önanthat und -undecylat während mehr als 7 Wochen wirksam sind.

Dieselben Ergebnisse findet man, wenn einmal looo γ Östradiol-Ester an kastrierte Rattenweibchen injiziert werden.

Tabelle 12: Östrusdauer nach Verabreichung von looo γ Östradiol-Ester

Substanz	Östrusdauer in Tagen
Östradiol-butyrat	3o
" -valerianat	48
" -capronat	48
" -önanthat	mehr als 7o
" -caprylat	63
" -undecylat	mehr als 7o
" -benzoat	32

Auch an dem Gewicht des Thymus kastrierter Rattenweibchen, die täglich mit freiem Östradiol oder einmalig mit verschiedenen Estern behandelt wurden, lassen sich Veränderungen gegenüber dem unbehandelter Kontrolltiere feststellen, wenn auch der Uterus als Testorgan bedeutend empfindlicher ist. Es wurde nun gefunden:

Der Thymus unbehandelter kastrierter Ratten besitzt durchweg ein höheres Gewicht als der behandelter Tiere.

Das Thymusgewicht der mit einmal looo γ Östradiol-Ester gespritzten Ratten ist sehr gering und bleibt, besonders bei den Tieren nach Undecylatgabe, über lo Wochen niedrig.

Auch der Thymus der kastrierten Ratten, denen loo γ Östradiol-Ester verabreicht wurde, ist zurückgebildet, wenn auch nicht so stark wie nach der Injektion der lo-fach höheren Dosis.

Eine einmalige Gabe von lo γ hat ebenfalls Thymusgewichte zur Folge, die unter denen unbehandelter kastrierter Ratten liegen, aber größer sind als die der Tiere, denen die höheren Dosen injiziert wurden. Noch kleinere Dosen sind wirkungslos.

Die tägliche Verabreichung von loo, lo, 4 bzw. 1 γ freiem Östradiol bewirkt - ebenso wie die einmalige Gabe von loo oder looo γ Ester - einen starken Gewichtsrückgang des Thymus in den ersten Tagen nach Beginn der Injektionen und hält das geringe Gewicht dieses Organs über den beobachteten Zeitraum von 11 Wochen aufrecht.

Ein Einfluß des täglich verabreichten Östradiols oder einmalig injizierter Östradiol-Ester auf das Gewicht des Herzens kastrierter Rattenweibchen ist nicht zu erkennen.

Auch die Größe der Nieren kastrierter Rattenweibchen wird praktisch durch Verabreichung von östrogenen Substanzen in diesen Dosierungen nicht verändert.

Ebenso läßt sich aus dem Gewicht der Milz, das größere Schwankungen aufweist, ein Einfluß von Östradiol oder seinen Estern nicht erkennen.

B. Testosteron-Ester

Die Wirkung androgener Substanzen wurde an kastrierten männlichen Ratten geprüft, als Vergleich wurden unbehandelte kastrierte und nichtkastrierte Rattenmännchen benutzt. In der folgenden Tabelle sind die Gewichte verschiedener Organe kastrierter und normaler Tiere verglichen.

Tabelle 13: Gewichte von Samenblasen und Prostata (mg/loo g Ratte) normaler und kastrierter Tiere

Wochen nach Kastration	Samenblasen norm.	Samenblasen kastr.	Prostata norm.	Prostata kastr.
0	51	-	64	-
1	-	23	-	16
2	39	26	61	12
3	-	33	-	15
4	-	18	-	19
5	215	28	122	9
6	-	23	-	18

Die akzessorischen Geschlechtsorgane Samenblasen und Prostata der kastrierten Ratten werden nach der Operation stark zurückgebildet, während die der intakten Tiere allmählich heranwachsen.

Dagegen tritt nach der Verabreichung der verschiedenen Testosteron-Ester an kastrierte Ratten eine beträchtliche Gewichtserhöhung von Samenblasen und Prostata auf, die vom Säureanteil des Esters abhängt.

In den folgenden Tabellen und Abbildungen sind die Gewichte der Samenblasen und Prostata der mit Testosteron-Estern behandelten Tiere zusammengestellt.

Tabelle 14: Samenblasengewichte (mg/loo g Ratte) der mit Testosteron-Estern behandelten Tiere

Substanz	1	2	3	4	5	6	7 Wochen nach Inj.
Acetat	125	51	35	39	31	-	-
Propionat	132	226	17o	42	93	-	-
Butyrat	186	333	136	115	1o2	42	-
Valerianat	176	584	419	4o3	439	166	-
Capronat	15o	528	883	497	291	179	-
Önanthat	174	62o	951	777	752	392	1o8
Caprylat	274	53o	829	493	668	553	-
Diacetat	253	484	357	113	84	-	-

Tabelle 15: Prostatagewichte (mg/loo g Ratte) der mit Testosteron-Estern behandelten Tiere

Substanz	1	2	3	4	5	6	7 Wochen nach Inj.
Acetat	291	13o	43	26	27	-	-
Propionat	317	321	251	37	1o4	-	-
Butyrat	327	433	3o8	274	195	92	-
Valerianat	319	541	44o	42o	5o4	383	-
Capronat	298	649	732	593	411	283	-
Önanthat	278	656	938	957	779	583	218
Caprylat	373	617	739	539	599	567	-
Diacetat	385	537	368	2o9	214	-	-

Abbildung 5: Samenblasengewichte (mg/100 g Ratte) kastrierter Rattenmännchen nach Injektion von Testosteron-Estern
K = unbehandelte Kastraten
1 = Acetat
2 = Propionat
3 = Butyrat
4 = Valerianat
5 = Capronat
6 = Önanthat
7 = Caprylat
8 = Diacetat

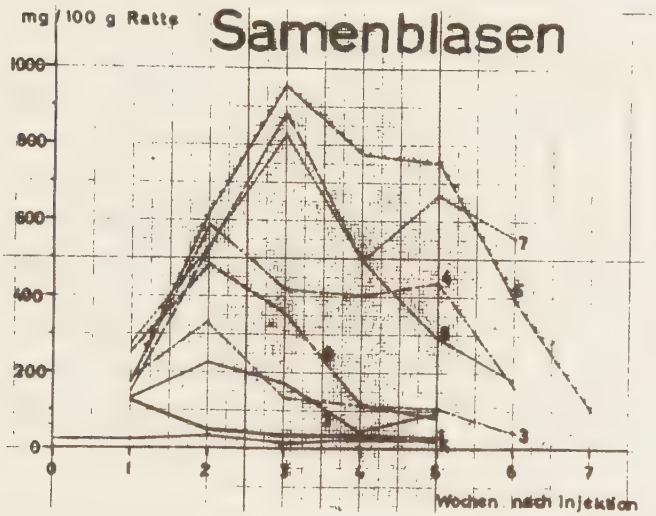
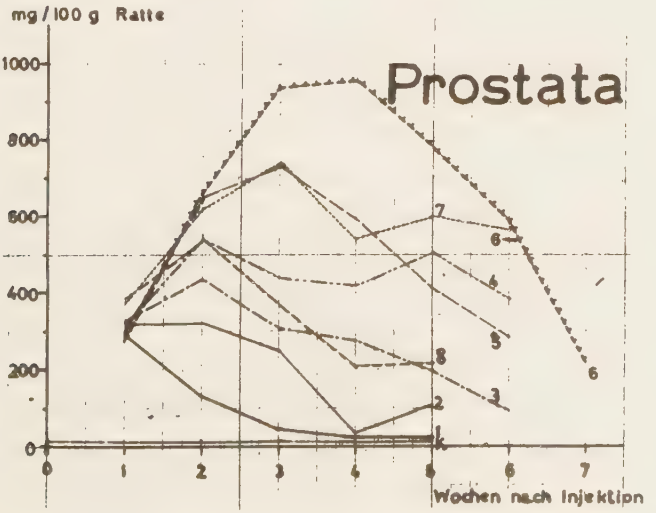


Abbildung 6: Prostatagewichte (mg/100 g Ratte) kastrierter Rattenmännchen nach Injektion von Testosteron-Estern
(Bezeichnungen wie bei Abb. 5)



Im einzelnen wurde nun festgestellt:

Innerhalb der ersten Woche nach der Injektion findet sich die stärkste Einwirkung auf das Wachstum von Samenblasen und Prostata beim Testosteron-acetat. Innerhalb der zweiten Woche nach der Injektion wirken Testosteron-propionat, -butyrat, -diacetat und -valerianat am stärksten. Die Testosteron-Ester der Capron-, Önanth- und Caprylsäure dagegen entfalten ihre größte Wirksamkeit erst innerhalb der dritten Woche nach der Injektion.

Nicht nur die zeitliche Lage, auch die absolute Größe des Maximalgewichtes von Samenblasen und Prostata ist von der Art der veresterten Säure abhängig. Während die Samenblasen unter dem Einfluß des Testosteron-acetats maximal nur ein Gewicht von 125 mg/loo g erreichen, findet sich nach Einwirkung der Ester der höheren Fettsäuren eine erheblich stärkere Gewichtszunahme. Die entsprechenden Werte der Prostatagewichte zeigen die gleiche Tendenz.

Die Testosteron-Ester der niedrigen Fettsäuren bewirken in erster Linie eine Gewichtserhöhung der Prostata der behandelten Ratten, die Ester der höheren Fettsäuren dagegen beeinflussen stärker das Samenblasenwachstum. Während die Prostata der mit Testosteron-acetat behandelten Tiere im Maximum ungefähr doppelt so schwer ist wie die Samenblasen, - bei den mit Testosteron-propionat und -butyrat gespritzten Ratten verhalten sich die Gewichte von Prostata und Samenblasen ungefähr wie 4:3 - wird nach Zufuhr der Testosteron-Ester der höheren Fettsäuren das Gewicht der Prostata von dem der Samenblasen übertroffen. Bei nachlassendem Hormoneinfluß sinkt das Samenblasengewicht allerdings dann schnell wieder ab.

Die Zufuhr der Ester des Testosterons mit den höheren Fettsäuren hat nicht nur eine beträchtliche Gewichtserhöhung von Samenblasen und Prostata zur Folge, das hohe Gewicht dieser Organe wird außerdem über

längere Zeit aufrechterhalten. Die Samenblasen und Prostata der mit Testosteron-valerianat, -capronat, -önanthat und -caprylat gespritzten Tiere sind noch 6 Wochen nach der Injektion deutlich vergrößert.

Von der Art der mit Testosteron veresterten Säure sind also abhängig:

1) der Zeitpunkt der stärksten Entwicklung von Samenblasen und Prostata,
2) das absolute Gewicht dieser Organe,
3) das Gewichtsverhältnis von Samenblasen und Prostata zur Zeit der maximalen Entwicklung,
4) die Dauer des Zeitintervalls, in dem ein Hormoneinfluß, der in einer Vergrößerung dieser Organe sichtbar wird, wahrzunehmen ist.

Ein Einfluß auf das Thymusgewicht kastrierter Rattenmännchen durch Behandlung mit Testosteron-Estern ist vorhanden. Das Thymusgewicht der unbehandelten Kastraten bleibt relativ hoch. Die Testosteron-Ester der niedrigen Fettsäuren halten zur Zeit der stärksten Hormoneinwirkung, d.h. innerhalb der ersten Woche nach der Injektion, das Thymusgewicht niedrig. Bei nachlassendem Hormoneinfluß steigt das Gewicht dieses Organs wieder an. Das Thymusgewicht der Ratten, denen die das Samenblasenwachstum stark aktivierenden Testosteron-Ester mit Valerian-, Capron-, Önanth- und Caprylsäure injiziert wurden, bleibt während der gesamten Beobachtungszeit niedrig, der Hormoneinfluß ist also innerhalb der ganzen Zeit wirksam.

Die Untersuchungen über den Einfluß der Testosteron-Ester auf die Nieren lieferten folgende Ergebnisse:

Eine Einwirkung der geprüften Substanzen auf das Gewicht der Nieren ist zweifellos vorhanden. Die behandelten Tiere zeigen durchweg ein größeres Gewicht dieses Organs als die unbehandelten Kastraten. Besonders erhöhen die im Samenblasentest wirksamsten Ester das Nierengewicht beträchtlich, weniger wirksam sind die übrigen Testosteron-Ester.

Das Gewicht der Milz der behandelten Tiere weist so starke Schwankungen während des Beobachtungsintervalls auf, daß ein direkter Einfluß der verwendeten Substanzen in irgend einer Richtung nicht erkennbar ist.

C. Cortison-Ester

Das Gewicht des Thymus infantiler Rattenmännchen wird durch Cortison-Injektionen verändert, wie die folgende Tabelle zeigt.

Tabelle 16: Thymusgewichte (mg/loo g Ratte) der mit Cortison-Estern behandelten infantilen Ratten

Substanz	Dosis in mg	0	1	2	4	6	8 Tage nach Injektion
Kontrollen	-	235	236	199	162	-	25o
C.-acetat	8	-	116	51	5o	-	93
"	4	-	12o	73	8o	142	-
"	2	-	114	11o	151	-	-
"	1	-	138	148	183	-	-
C.-önanthat	8	-	128	42	52	-	8o
"	4	-	153	54	46	-	97
"	2	-	142	74	65	-	1o9
"	1	-	148	71	1oo	-	177

Nach der Verabreichung von Cortison-acetat an infantile Ratten wurde gefunden (siehe Abbildung 7):

Das Thymusgewicht der mit reinem Öl gespritzten Kontrolltiere ist höher als das behandelter Ratten und schwankt um 2oo mg/loo g.

Die Injektion von einmal 8 mg Cortison-acetat beeinflußt das Thymusgewicht am stärksten, 4 und 2 mg wirken ebenfalls, 1 mg kaum noch.

Der Thymus der mit 8 und 4 mg Cortison-acetat behandelten Tiere ist 4 Tage nach der Injektion ebenso klein wie nach 2 Tagen, während 2 mg keinen Einfluß mehr zeigen.

8 mg Cortison-acetat verhindern das Thymuswachstum noch nach 8 Tagen, dagegen haben 4 mg nach 6 Tagen keinen Einfluß mehr.

Abbildung 7: Thymusgewichte (mg/loo g Ratte) infantiler Rattenmännchen nach Injektion verschiedener Dosen von Cortison-acetat

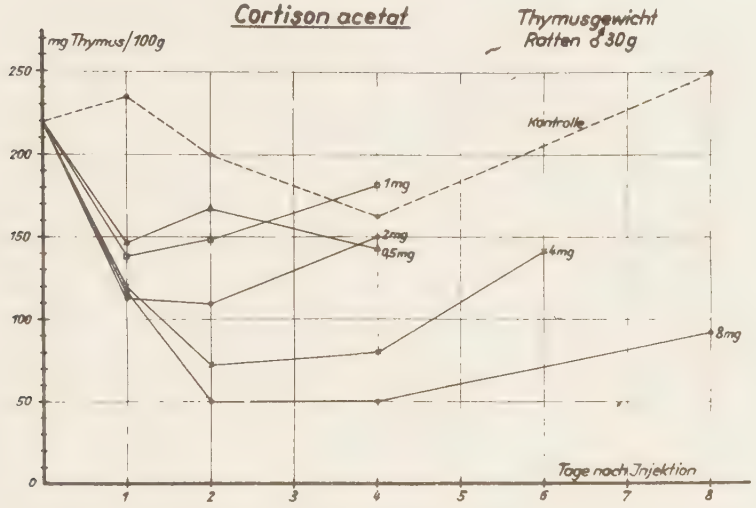
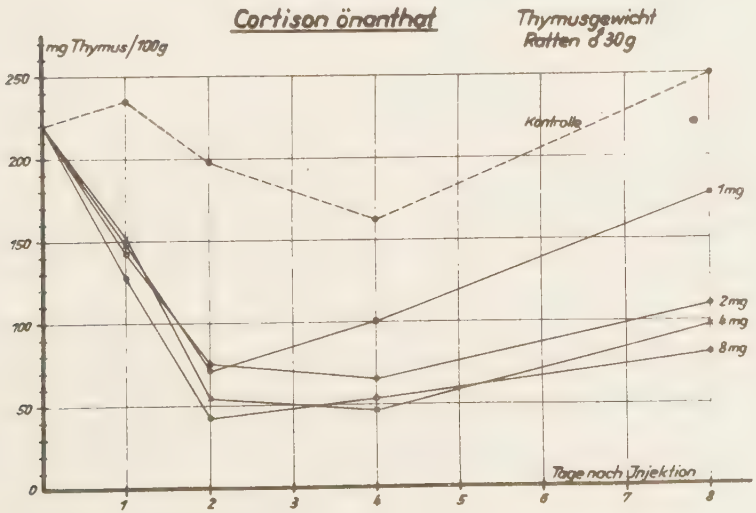


Abbildung 8: Thymusgewichte (mg/loo g Ratte) infantiler Rattenmännchen nach Injektion verschiedener Dosen von Cortison-önanthat



Die Injektion von Cortison-önanthat lieferte folgende Ergebnisse (siehe Abbildung 8):

Das Thymusgewicht der mit reinem Sesamöl gespritzten Kontrolltiere ist größer als das der mit Cortison-önanthat behandelten Rattenmännchen.

Die Injektion von 8 mg Cortison-önanthat beeinflußt das Thymusgewicht am stärksten, 4, 2 und 1 mg wirken ebenfalls.

Der Thymus der mit 8, 4 und 2 mg Cortison-önanthat behandelten Tiere ist 4 Tage nach der Injektion ebenso klein wie nach 2 Tagen, die 1-mg-Dosis ist zu dieser Zeit nicht mehr so wirksam.

8, 4 und 2 mg Cortison-önanthat verhindern das Thymuswachstum noch 8 Tage nach der Injektion, während 1 mg zu dieser Zeit keine Aktivität mehr besitzt.

Ein Vergleich der Wirkungen von einer einmaligen Injektion von Cortison-acetat mit -önanthat ergab folgende Resultate:

Das Thymusgewicht infantiler Rattenmännchen wird nach einer Injektion von 8, 4 oder 2 mg Cortison-acetat schon innerhalb von 24 Stunden bedeutend erniedrigt, während die Wirksamkeit einer Cortison-önanthat-Injektion zu dieser Zeit noch nicht so stark ausgeprägt ist.

2 Tage nach der Verabreichung sind Cortison-önanthat-Injektionen bedeutend aktiver als -acetat-Gaben. 1 und 2 mg Önanthat besitzen die Wirksamkeit von 4 mg Acetat, 4 mg Önanthat entsprechen 8 mg Acetat.

Noch 4 Tage nach der Injektion beeinflußt die Gabe von 2 mg Önanthat das Thymuswachstum stärker als die von 4 mg Acetat, 4 mg Önanthat entsprechen wieder 8 mg Acetat.

Während nur 8 mg Acetat noch 8 Tage nach der Verabreichung einen größeren Einfluß auf den Thymus ausüben, verringern noch 2 mg Önanthat sein Gewicht sehr stark, 4 und 8 mg Önanthat sind noch aktiver.

Um die starken und lang anhaltenden Wirkungen von Cortison-önanthat zu

erreichen, sind also ungefähr 3 bis 4 mal so große Gaben von Cortisonacetat erforderlich.

Ein deutlich wahrnehmbarer Einfluß auf das Gewicht der übrigen untersuchten Körperorgane - Nebennieren, Hoden, Samenblasen, Prostata, Herz und Nieren - der infantilen Rattenmännchen nach Cortison-Ester-Injektionen war innerhalb der Beobachtungszeit von 8 Tagen im allgemeinen nicht festzustellen.

Wenn auch das Gewicht der Milz infantiler Ratten in den ersten Tagen nach Cortisonzufuhr verkleinert wird, so sind doch keine Unterschiede in der Wirksamkeit der einzelnen Dosen erkennbar.

Diskussion

Unter den untersuchten Steroidhormon-Estern besitzen Östradiol-, Testosteron- und vielleicht Cortison-önanthat optimale Wirkungsstärke und Wirkungsdauer. Östradiol-undecylat bzw. Testosteron-capronat und -caprylat stehen nur wenig nach. Alle diese Ester weisen sehr niedrige Schmelzpunkte auf, die mit einer besonders guten Löslichkeit in Sesamöl parallel gehen.

Als wesentlich für die starke Protraktion und damit starke Wirksamkeit einiger Ester kann man deren verzögerte Resorption ansehen (66). Es wäre auch denkbar, daß die Resorption schnell erfolgt und Intensität und Dauer der Wirkung durch die Art der Verteilung oder Verseifungsgeschwindigkeit der einzelnen Ester im Körper bestimmt wird.

Einen unmittelbaren Einfluß der ungespaltenen Ester verneinen allerdings Myers und Simons (64), sie fanden, daß Testosteron-propionat nach Verabreichung von Tri-o-kresyl-phosphat keine androgene Aktivität entfaltet, während freies Testosteron trotzdem wirkt. Die durch Tri-o-kresylphosphat gehemmten Esterasen (63) sind wohl für die Hydrolyse und vielleicht auch Synthese von Testosteron-Estern verantwortlich (2o). Bestätigungen dieser Befunde stehen allerdings noch aus, und es steht nicht fest, ob sie allgemeine Gültigkeit für alle Hormonester besitzen.

Die auf Protraktion untersuchten Steroidhormon-Ester weisen beträchtliche Unterschiede in ihrer Wirkungsstärke und Wirkungsdauer auf. Während die Auslösung und Aufrechterhaltung des Östrusstadiums keine Aussage über die Wirkungsintensität der untersuchten Ester erlaubt, ist deren Wirkungsdauer gut feststellbar. Sie ist, wie die Abbildung 9 zeigt, abhängig von der Länge der veresterten Säure, sie nimmt mit wachsender Anzahl der C-Atome der Fettsäure zu. Die Ester der Säuren mit ungerader Zahl der C-Atome scheinen stärker zu protrahieren als

die der um ein C-Atom längeren geradzahligen Fettsäuren.

Abbildung 9: Abhängigkeit der Östrusdauer nach einmaliger Verabreichung verschiedener Dosen Östradiol-Ester von der Länge der Fettsäure des Esters

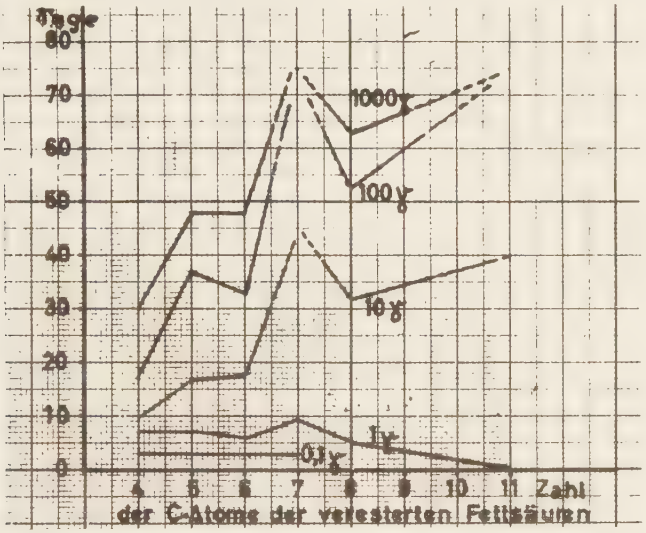
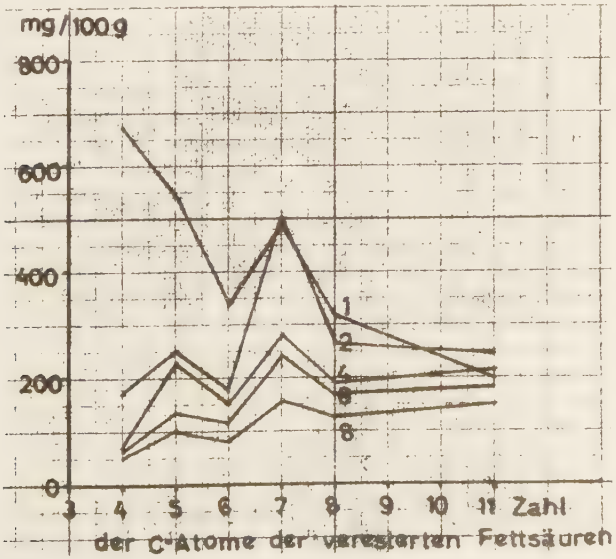


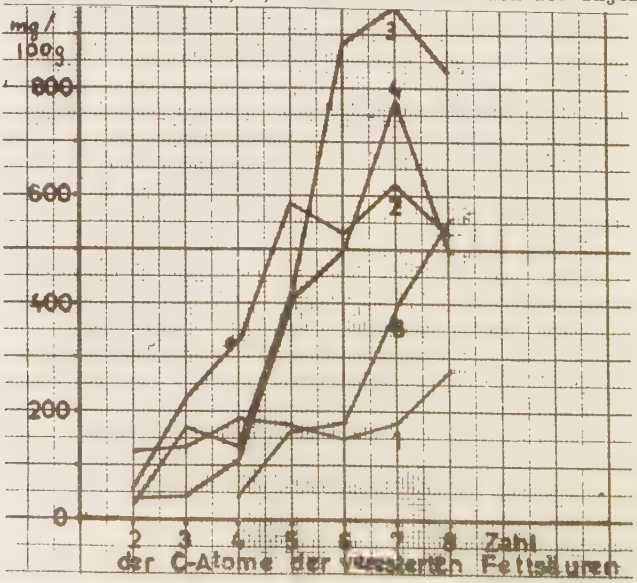
Abbildung 10: Abhängigkeit des Uterusgewichtes nach Verabreichung von einmal 100 γ Östradiol-Ester von der Länge der Fettsäure des Esters (1, 2, 4 usw. = Wochen nach der Injektion)



Die Gewichtsänderungen des Uterus kastrierter Rattenweibchen sind dagegen ein Maß für die Intensität der Wirkung der verabreichten Substanzen. Aus der Abbildung lo geht hervor, daß die Wirkungsstärke mit wachsender Zahl der C-Atome der Fettsäure in den Hormonestern einem Optimum zustrebt, um dann mit steigender Zahl der C-Atome langsam wieder abzunehmen. Diese optimale Wirkungsintensität kommt dem Östradiol-önanthat zu.

Die Änderungen des Samenblasengewichtes kastrierter Rattenmännchen, die nach Zufuhr von Testosteron-Estern auftreten, sind ein Maß für die Intensität der androgenen Wirksamkeit. Wie die Abbildung 11 zeigt, nimmt die Wirkungsintensität zu mit wachsender Zahl der C-Atome der Fettsäure bis zu einem Optimum. Die Wirkungsdauer dagegen, erkennbar an der langen Aufrechterhaltung eines hohen Samenblasengewichtes, nimmt, bei nachlassender Intensität, mit steigender Anzahl der C-Atome des Säureanteils über das Önanthat hinaus - ebenso wie bei den Östrogenen - zu. Damit stimmt Mieschers Beobachtung (59) überein, der im Testosteron-palmitat eine Substanz von sehr geringer Wirkungsintensität, aber sehr langer Wirkungsdauer fand.

Abbildung 11: Abhängigkeit des Samenblasengewichtes nach Verabreichung von einmal 2o mg Testosteron-Ester von der Länge der Fettsäure des Esters (1, 2, 3 usw. = Wochen nach der Injektion)



Ebenso wie die oben erwähnten Substanzen Östradiol und Testosteron wirkt das mit einer höheren Fettsäure veresterteCortison erheblich intensiver und länger. Der Effekt, durch Gewichtsverminderung des Thymus gut sichtbar, ist beim Cortison-önanthat nicht nur mit kleineren Dosen erzielbar und stärker ausgeprägt, sondern auch bedeutend länger anhaltend als beim Cortison-acetat.

Die besonders schweren Samenblasen, die nach der Injektion der Testosteron-Ester mit den höheren Fettsäuren auftreten und das Gewicht der Prostata noch übertreffen, sind prall mit großen Mengen von Sekret gefüllt. Bei nachlassendem Hormoneinfluß nimmt das Gewicht sehr schnell wieder ab, denn die Rückbildung des Drüsenepithels der Prostata geht langsamer vonstatten als die Verminderung der Sekretmenge in den Samenblasen. Quantitative Aussagen lassen sich aus den Gewichtsänderungen der Prostata wohl besser machen, allerdings eignet sich der Samenblasentest ausgezeichnet für qualitative Folgerungen, da die Organe sehr leicht und exakt herauspräpariert werden können.
Bei der Feststellung des Uterusgewichtes sind durch wechselnde, besonders am Anfang sehr reichlich vorhandene Sekretmengen stärkere Gewichtsunterschiede der einzelnen Tiere zu finden.

Zusammenfassung

1) Es wurden eine Anzahl Ester der Steroidhormone Östradiol, Testosteron und Cortison auf ihre Wirkungsintensität und Wirkungsdauer untersucht.

2) Es wurden die Östradiol-17-Ester: -butyrat, -valerianat, -capronat, -önanthat, -caprylat und -undecylat und dazu Östradiol-3-benzoat verglichen.
Es ergibt sich, daß die Wirkungsdauer mit zunehmender Länge der veresterten Fettsäure zunimmt. Die Intensität der Wirkung nimmt zu bis zum Östradiol-önanthat, dann nimmt sie langsam ab.

3) Die Testosteron-17-Ester der Essig-, Propion-, Butter-, Valerian-, Capron-, Önanth- und Caprylsäure und das Testosteron-diacetat wurden auf ihre androgene Wirksamkeit untersucht.
Eine optimale Wirkung entfaltet das Testosteron-önanthat, die Wirkungsdauer ist bei abgeschwächter Intensität bis zum Testosteron-caprylat verlängert. Testosteron-diacetat wirkt intensiver und länger anhaltend als das -monoacetat.

4) Auch beim Cortison läßt sich eine Erhöhung der Wirkungsintensität und Wirkungsdauer am Vergleich des Cortison-acetats und -önanthats feststellen.

5) Das Verhalten anderer Körperorgane wurde in die Untersuchung mit einbezogen.

Literatur

1) Allen u. Doisy: J. Am. Med. Ass. 81:819, 1923

2) Allen u. Mitarbeiter: Am. J. Anat. 34:133, 1924

3) Allen u. Doisy: Sex and Internal Sekretions, Williams & Wilkins, Baltimore, 1939

4) Berthold: Arch. Anat. u. Physiol, Physiol. Abt. 1849, S. 42

5) Bishop u. Folley: Lancet 6/II:229, 1951

6) Brock u. Druckrey: Klin. Wschr. 17:23, 1938

7) Burrows: Biological Actions of the Sex Hormones, Cambridge Univ. Press, Cambridge 1945

8) Butenandt: Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 191:14o, 193o

9) Butenandt: Z. angew. Chemie 45:655, 1932

1o) Butenandt u. Tscherning: Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 229:185, 1934

11) Callow u. Deanesly: Biochem. J. 29:1424, 1935

12) Carlinfanti, D'Alo u. Cutolo: Lancet 256:6551, 1949

13) Chiody: Endocrinology 26:1o7, 194o

14) Clausen: Endocrinology 27:985, 194o

15) Crede: Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 43:4o, 194o

16) David, Dingemanse, Freud u. Laqueur: Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 233:281, 1935

17) Deanesly u. Parkes: Lancet 23o:837, 1936

18) Deanesly u. Parkes: Proc. Roy. Soc. London 124:279, 1937

19) Deanesly u. Parkes: Chemistry and Industry 56:447, 1937

2o) Dingemanse, Freud u. Polak: Arch. Int. Pharmacodyn. 76:44, 1948

21) Dougherty: Endocrinology 35:1, 1944

22) Emmens: Endocrinology 28:633, 1941

23) Evans u. Hoch: Endocrinology 28:747, 1941

24) Eversole, Leathem u. Schraer: Endocrinology 47:448, 195o

25) Falley: Nature 15o:4o3, 1942

26) Forbes: Endocrinology 29:7o, 1941

27) Gallagher u. Koch: Endocrinology 18:1o7, 1934

28) Greenberg u. Noble: Physiol. Zool 17:392, 1944

29) Hamburger u. Kaae: Acta Endocr. Danica 2:257, 1949

3o) Hamburger: Schweiz. Med. Wschr. 81:995, 1951

31) Ingle: Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 44:174, 194o

32) Ingle u. Mason: Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 39:154, 1938

33) Jones u. Korenchevsky: J. Gerontol. 1:336, 1946

34) Junkmann: Ärztl. Wschr. 7:449, 1952

35) Junkmann: Arch. Exper. Path. Pharmakol. 215:85, 1952

36) Kahut u. Doisy: Endocrinology 12:76o, 1928

37) Kochakian: Vitamins and Hormones 4:255, 1946

38) Korenchevsky: Biochem. J. 26:413, 1932

39) Korenchevsky: Biochem. J. 26:13oo, 1932

4o) Korenchevsky: Biochem. J. 26:2o97, 1932

41) Korenchevsky u. Dennison: Biochem. J. 28:1486, 1934

42) Korenchevsky u. Dennison: J. Path. Bact. 38:231, 1934

43) Korenchevsky, Dennison u. Brovsin: Biochem. J. 3o:558, 1936

44) Korenchevsky, Dennison u. Eldridge: Biochem. J. 31:475, 1937

45) Korenchevsky, Dennison u. Kohn-Speyer: Biochem. J. 27:557, 1933

46) Korenchevsky, Dennison u. Simpson: Biochem. J. 29:2534, 1935

47) Korenchevsky u. Hall: J. Path. Bact. 45:681, 1937

48) Korenchevsky u. Jones: J. Gerontol. 1:319, 1946

49) Korenchevsky u. Ross: Brit. Med. J. 1:645, 194o

5o) Ludden, Krueger u. Wright: Endocrinology 28:619, 1941

51) Marshall: The Physiology of Reproduction, Longmans, New York and London, 1922

52) Meier, Gasche u. Frey: Schweiz. Med. Wschr. 76:1o7, 1946

53) Meier u. Gross: Dtsch. Med. Wschr. 75:115o, 195o

54) Miescher, Fischer u. Tschopp: Biochem. Z.3oo:14, 1937

55) Miescher, Gasche u. Frey: Helv. Physiol. Acta 2:515, 1944

56) Miescher, Kägi, Scholz, Wettstein u. Tschopp: Biochem. Z. 294:39, 1937

57) Miescher, Scholz u. Tschopp: Biochem. J. 32:141, 725, 1273 (1938)

58) Miescher, Wettstein u. Tschopp: Schweiz. Med. Wschr. 66:312, 1936

59) Miescher, Wettstein u. Tschopp: Biochem. J. 3o:1977, 1936

6o) Miescher, Wettstein u. Tschopp: Biochem. J. 3o:197o, 1936

61) Moore, Price u. Gallagher: Am. J. Anat. 45:71, 193o

62) Moradian, Cavallito, Bergmann, Lawson u. Suter: J. Am. Chem. Soc. 71:3372, 1949

63) Myers u. Mendel: Biochem. J. 53:16, 1953

64) Myers u. Simons: Biochem. J. 53:17, 1953

65) Parkes: The Internal Secretions of the Ovary, Longmans & Green, London 1929

66) Parkes: Lancet 231:674, 1936

67) Polak, Dingemanse u, Freud: Acta brev. neel. Physiol. 6:53, 1936

68) Polak, Dingemanse u. Freud: Med. Tijdschr. Geneesk. 8o:2175, 1936

69) Reinhardt u. Mitarbeiter: Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 45:267, 194o

7o) Ruzicka, Goldberg, Meyer, Brungger u. Eichenberger: Helv. Chim. Acta 17:1395, 1934

71) Ruzicka, Goldberg u. Meyer: Helv. Chim. Acta 18:994, 1935

72) Ruzicka u. Wettstein: Helv. Chim. Acta 19:1141, 1936

73) Sakamoto, Gordan u. Eisenberg: Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 76:4o6, 1951

74) Schoeller, Dohrn u. Hohlweg: Arch. Gynäk. 15o:126, 1932

75) Schoeller u. Gehrke: Klin. Wschr. 17:694, 1938

76) Schwenk u. Hildebrandt: Naturwiss. 1933:177

77) Selye: Brit. J. Exper. Path. 17:234, 1936

78) Selye: Endocrinology 21:169, 1937

79) Selye: Anat. Rec. 76:145, 194o

8o) Selye: Endocrinology 27:657, 194o

81) Tschopp: Schweiz. Med. Wschr. 8o:673, 195o

82) Wells u. Kendall: Proc. Staff. Meet. Mayo Clinic 15:133, 194o

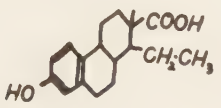
83) Williams: Am. J. Anat. 83:247, 1948

Teil II

Untersuchungen über die biologische Wirkung von Steroidhormon-Derivaten mit offenem D-Ring

Einleitung

Durch die Arbeiten von Doisy und Miescher (1) wurden Steroid-Derivate der Östran-Reihe mit offenem D-Ring bekannt, unter denen die Doisynolsäure und die Bisdehydrodoisynolsäure eine hohe östrogene Wirkung haben. Die entsprechenden Aldehyde und Carbinole zeigten ebenfalls östrogene Wirksamkeit (2).



Doisynolsäure

Die von Heer und Miescher (3) hergestellten "Perhydrodoisynolsäuren" waren sowohl östrogen als auch androgen unwirksam. Da jedoch die natürlich vorkommenden Androgene Keto- und Carbinolgruppen und keine Carboxylgruppen enthalten, wurden Steroid-Derivate mit offenem D-Ring und entsprechenden funktionellen Gruppen hergestellt und auf ihre biologische Wirksamkeit geprüft (Hillmann 4).

Es sollte nun versucht werden, in diese Steroid-Derivate mit offenem D-Ring Halogen einzubauen. Es bestünde so die Möglichkeit, den Stoffwechsel dieser Verbindungen durch Markierung mit ^{36}Cl und ^{131}J zu untersuchen und damit die Frage zu prüfen, wieweit Unterschiede im Stoffwechsel derartiger Verbindungen gegenüber natürlich vorkommenden Steroiden bestehen.

Für die Synthese wurden folgende Möglichkeiten in Aussicht genommen (siehe Formelbilder):

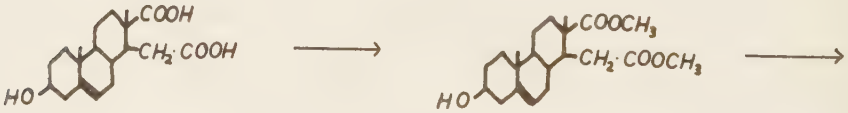
Der erste Weg sollte vom Dimethylester (II) der Δ^5-3β-Hydroxyätiobiliensäure (I) ausgehen, aus dem durch Reduktion mit $LiAlH_4$ Substanz III und anschließende Oxydation nach Oppenauer Substanz IV synthetisiert werden sollte, die durch Chlorierung Substanz V liefern sollte.

I

Δ^5-3β-Hydroxyätiobiliensäure

II

Δ^5-3β-Hydroxyätiobiliensäure-dimethylester

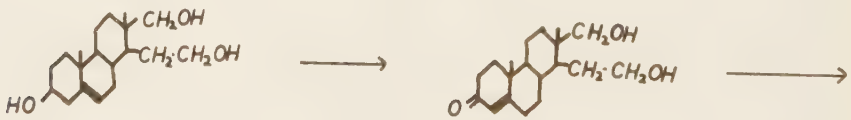


III (Triol)

Δ^5-16.17-Seco-androsten-triol-(3β,16,17)

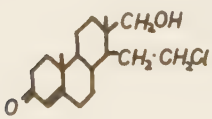
IV

Δ^4-16.17-Seco-androstenon-(3)-diol-(16,17)



V

Δ^4-16.17-Seco-chlor-(16)-androstenon-(3)-ol-(17)



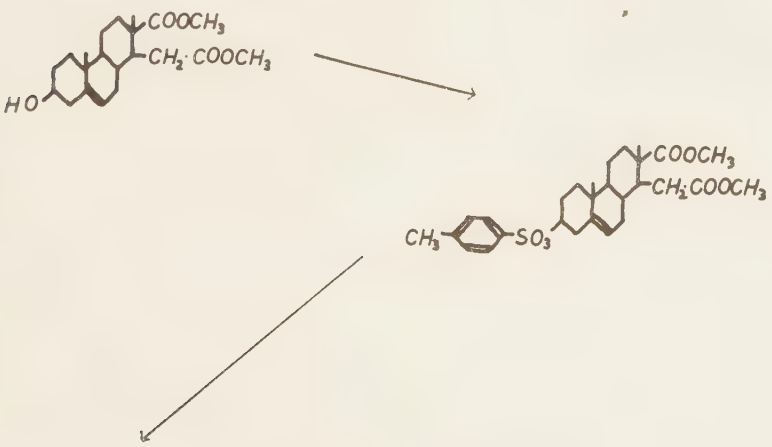
Ein zweiter Syntheseweg sollte vom Ester II über den Tosylester VI zum i-Äther VII führen, aus dem durch Reduktion mit $LiAlH_4$, Chlorierung, Umlagerung und Verseifung Substanz XI entstehen sollte. Durch Bromierung von Substanz VIII, Umlagerung und Verseifung sollte Substanz XII, durch Austausch von Cl gegen J bei Substanz XI sollte Verbindung XIII synthetisiert werden. Eine Oppenauer-Oxydation von XI sollte ebenfalls zur Substanz V führen.

II

Δ^5-3β-Hydroxyätiobiliensäure-dimethylester

VI (Tosylester)

Δ^5-3β-Hydroxyätiobiliensäure-dimethylester-tosylat-(3)



VII (i-Äther)

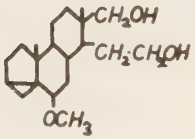
$\Delta^{3,5}$-Ätiobiliensäuredimethyl-ester-isomethyläther-(6)

VIII (i-Diol)

$\Delta^{3,5}$-16.17-Seco-androstendiol-(16,17)-isomethyläther-(6)

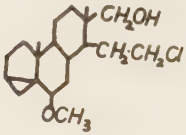
VIII (i-Diol)

$\Delta^{3,5}$-16.17-Seco-androstendiol-(16,17)-isomethyläther-(6)



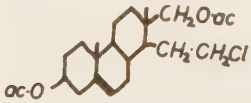
IX

$\Delta^{3,5}$-16.17-Seco-chlor-(16)-androsten-ol-(17)-isomethyläther-(6)



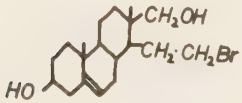
X (Cl-diacetat)

Δ^{5}-16.17-Seco-chlor-(16)-androsten-diol-(3β,17)-diacetat



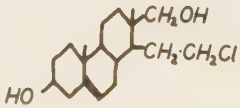
XII (Br-diol)

Δ^{5}-16.17-Seco-brom-(16)-androstendiol-(3β,17)



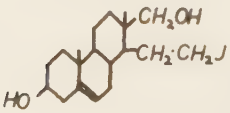
XI (Cl-diol)

Δ^{5}-16.17-Seco-chlor-(16)-androsten-diol-(3β,17)



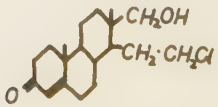
XIII (J-diol)

Δ^{5}-16.17-Seco-jod-(16)-androstendiol-(3β,17)



V

Δ^{4}-16.17-Seco-chlor-(16)-androsten-on-(3)-ol-(17)



Anschließend sollten die verschiedenen Substanzen auf östrogene und androgene Wirksamkeit geprüft werden, wobei mehrere Testmethoden benutzt wurden, deren Einzelheiten im experimentellen Teil erläutert werden.

Experimenteller Teil

Die als Ausgangsmaterial zur Synthese dienende Δ^5-3β-Hydroxyätiobiliensäure I (5) wurde aus einer Rohsäure-Fraktion isoliert, die bei der Cholesterin-Oxydation der Firma Schering A.G. entstand.

3oo g Rohsäure wurden gepulvert und in 8oo ml lo % methanol. KOH gelöst und über Nacht stehen gelassen. Der gebildete Niederschlag, der das unlösliche K-Salz enthielt, wurde mehrmals mit Methanol gewaschen und abzentrifugiert, anschließend in Wasser gelöst, mit Kohlepulver gekocht, filtriert und die aus dem angesäuerten Filtrat ausgefallene Säure aus Aceton mehrmals umkristallisiert.

Ausbeute: ca. 2 % je nach der verwendeten Rohsäure-Fraktion.

Die Säure I wurde mit Diazomethan in Tetrahydrofuran in den Dimethylester II (5, 6) übergeführt, der mit siedendem n-Hexan (7) extrahiert und mehrmals umkristallisiert wurde.

Ausbeute: aus lo g Säure 8 g Ester = 74 %, Fp. lo8-lo9°.

Aus dem Ester II wurde durch Reduktion mit $LiAlH_4$ die Substanz III, Triol, dargestellt (4).

Ausbeute: aus 1 g Ester 576 mg Triol = 68 %, Fp. 193°.

Das erhaltene Triol III wurde mit Al-isopropylat und Cyclohexanon in Toluol nach Oppenauer oxydiert (4, 8) und das gebildete Oxydationsprodukt IV mit Girard T-Reagens isoliert (9).

Ausbeute: aus 1 g Triol 2oo mg Substanz IV = 2o %, Fp. 121°.

Die Substanz IV wurde nun mit Oxalylchlorid in Methylenchlorid bei 15° behandelt. Nach einstündigem Stehen wurde die Lösung in Eiswasser, das $NaHCO_3$ enthielt, gegossen und mit Chloroform extrahiert. Der Chloroform-Extrakt wurde gewaschen, getrocknet mit Na-sulfat und eingeengt. Der Rückstand zeigte schlechte Kristallisationseigenschaften und enthielt,

wie die Analyse ergab, nur geringe Mengen Chlor.

Analyse: Cl ber:1o,9 %, gef: 4,85 %.

Der zweite Syntheseweg ging ebenfalls vom Dimethylester II der Hydroxy-ätiobiliensäure I aus und führte zum Tosylester VI.

4,2 g Dimethylester wurden mit der gleichen Menge Tosylchlorid in 2o ml Pyridin 6o min. bei 38° und anschließend 3 Tage bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Die Pyridin-Lösung wurde in Eiswasser + HCl gegossen, der nach kurzem Stehen bei pH 2 ausgefallene Ester VI wurde aus Benzol-Petroläther umkristallisiert.

Ausbeute: aus 4,2 g Ester 5,6 g Tosylester = 93 %, Fp. 128-132°.

Der Tosylester VI wurde 6 Std. mit 28o ml Methanol und 2o ml Pyridin gekocht, wobei sich - analog dem Cholesterin-Tosylester (1o, 11) - der iso-Äther VII bildet, der nach Abdestillieren des Methanols und Zugabe von stark verdünnter HCl mit Petroläther extrahiert wurde. Der i-Äther kristallisierte nicht, der eingeengte Petroläther-Extrakt wurde sofort weiter mit $LiAlH_4$ in Äther reduziert.

Der aus 5,6 g Tosylester erhaltene i-Äther VII wurde mit 2,5 g $LiAlH_4$ in Äther 45 min. unter Rühren erhitzt. Anschließend wurde nach Zersetzen des überschüssigen Hydrids mit HCl Essigester dazugegeben. Die Äther-Essigester-Lösung wurde mit Wasser, HCl, Wasser, 1o % Soda, Wasser gewaschen, mit Na_2SO_4 getrocknet, eingeengt und der Rückstand aus Benzol-Petroläther umkristallisiert - Substanz VIII.

Ausbeute: aus 5,6 g Tosylester 2,4 g Substanz VIII = 69 %, Fp. 168-169°.

Um zum Produkt IX zu gelangen, wurden nach (12) 1,4 g i-Diol VIII mit 1,4 g getrocknetem Ca-carbonat und 3,6 g = 2,4 ml Thionylchlorid in Benzol 6o min. am Rückfluß gekocht. Die Benzol-Lösung wurde eingeengt, der Rückstand in Äther aufgenommen und mit verd. HCl zersetzt. Die ätherische Lösung wurde gründlich mit verd. NaOH und Wasser gewaschen, ein-

geengt und der Rückstand aus Benzol-Petroläther auskristallisiert. Da die erhaltene Substanz IX mit einem Fp. von 8o-85° nicht kristallisierte und, wie die Analyse ergab, ca. lo % Verunreinigungen enthielt,

Analyse Substanz IX: Cl ber: lo,4 %, gef: 9,5 %

wurde sie durch 6-stündiges Kochen mit 4o ml Eisessig und 2o ml Acetanhydrid in das Cl-diacetat X umgewandelt, das ebenfalls sehr schlecht kristallisierte.

Der Rückstand, der nach dem Kochen mit Eisessig-Acetanhydrid und Eingengen übrigblieb, wurde mit 3-fachem Überschuß methanol. KOH 9o min. bei Zimmertemp. verseift, neutralisiert und mit Äther extrahiert. Aus dem gewaschenen, eingeengten Äther-Extrakt wurde Substanz XI - Cl-diol - durch mehrmaliges Umkristallisieren aus Benzol-Petroläther isoliert. Da als Nebenprodukt etwas Triol III entstanden war, erwies es sich als nötig, die Substanz XI durch Chromatographie über Al_2O_3 zu reinigen. Die in Benzol-n-Hexan 2:1 gelöste Substanz wurde über Al_2O_3 (Woelm neutral) gegeben und mit Benzol eluiert. 25o mg ergaben 21o mg Cl-diol XI im Benzol-Eluat und 3o mg Triol III nach anschließender Elution mit Aceton. Ausbeute Cl-diol XI: 32 % (bezogen auf i-Diol VIII), Fp. 153°.

Analyse:	ber.	Cl: lo,9	C: 69,8	H: 9,5
	gef.	11,o3	69,39	9,58

Die Bromierung des i-Diols VIII wurde in folgender Weise durchgeführt: 1 g i-Diol wurde mit 0,7 ml Phosphortribromid in 35 ml Benzol 6o min. unter Rückfluß gekocht, anschließend wurde die Benzollösung in Wasser + Na-bicarbonat gegossen und mit Chloroform und Äther extrahiert. Der Extrakt wurde gewaschen und eingeengt. Der Rückstand wurde, wie oben beschrieben, mit Eisessig-Acetanhydrid 6 Std. gekocht und weiter mit methanol. KOH verseift.

Analyse: Br ber. 21,6 %, gef. 5,16 %.

Um in Substanz XI Cl gegen J auszutauschen, wurden 1,5 g Cl-diol XI mit 2 g NaJ in 6o ml Cyclopentanon 65 Std. unter Rückfluß gekocht, anschließend wurde in Äther aufgenommen, der Ätherextrakt mehrmals mit Wasser gewaschen, getrocknet und eingeengt. Das entstandene, in Petroläther lösliche Produkt ließ sich nicht kristallisieren.

Analyse: J ber. 3o,4 %, gef. 0,45 %.

Die Oxydation des Cl-diols XI wurde wie folgt durchgeführt:
1 g Cl-diol, 7o ml Toluol und 9 ml Cyclohexanon wurden zum Sieden erhitzt, 1,2 ml frisch dest. Al-isopropylat in wenig Toluol gelöst dazugegeben und 2o min. gekocht. Nach schnellem Abkühlen wurde in Äther aufgenommen und die ätherische Lösung mit HCl, Wasser, Soda, Wasser gewaschen, mit Na-sulfat getrocknet und vollkommen zur Trockne eingeengt. Aus dem Rückstand wurde das Oxydationsprodukt mit Girard T-Reagens (9) isoliert.

Analyse: Cl ber. 1o,9 %, gef. 0,92 %.

Die Analysen wurden von der Firma Dr.Ing. Schöller, Kronach, Oberfranken, ausgeführt. Sämtliche Schmelzpunkte waren unkorrigiert.

Von den synthetisierten Substanzen wurden folgende auf ihre östrogene und androgene Wirksamkeit geprüft:

a) Triol III,

b) i-Diol VIII,

c) Cl-diol XI.

Die östrogene Wirksamkeit wurde nach der von Allen und Doisy (13) beschriebenen Methode geprüft, die das Vorhandensein des Östrus aus der Zusammensetzung des Vaginalabstrichs kastrierter Rattenweibchen erkennen läßt. Als Testtiere dienten Rattenweibchen, die unter Äthernarkose kastriert wurden und einige Wochen später, als die Vaginalabstriche

das Fehlen jeglicher Schollen anzeigten, die Testsubstanzen durch subkutane Injektion erhielten. Von allen Tieren wurden zweimal täglich Vaginalabstriche gemacht, die mit Carbolfuchsin gefärbt wurden.

Für die androgene Testierung wurde die von Frank und Mitarbeitern (14) ausgearbeitete Kükenkamm-Testmethode benutzt, die eine Abwandlung des von Gallagher und Koch (15) eingeführten Kapaunkamm-tests ist. Als Testtiere dienten frisch geschlüpfte Küken, deren Behandlung im Alter von ca. 6o-7o Std. begann. Die Tiere erhielten täglich 8 Tage lang die zu prüfende Substanz, in Äther bzw. Chloroform gelöst, das Vorteil gegenüber Öl als Lösungsmittel bietet (16), auf den Kamm appliziert. Am lo. Tage nach Beginn der Verabreichung wurden die Küken mit Chloroform getötet, gewogen und die Kämme abpräpariert und auf einer Torsionswaage gewogen.

Weiterhin wurden infantile Rattenmännchen, die ca. 3o g schwer waren, 8 Tage lang mit der zu prüfenden Substanz subk. gespritzt. Die Tiere wurden am lo. Tage nach Beginn der Injektionen durch Chloroform getötet und die Samenblasen histologisch untersucht. Hierzu wurden Übersichtsfärbungen mit Hämatoxylin-Eosin durchgeführt.

Ergebnisse

Der erste Syntheseweg, der aus der Rohsäure-Fraktion über die Substanzen I, II und III verlief, brachte bis zum Triol III befriedigende Ausbeuten:

Ausbeute Δ^5-3β-Hydroxyätiobiliensäure I :
ca. 2 % je nach der verwendeten Rohsäure-Fraktion,

Δ^5-3β-Hydroxyätiobiliensäure-dimethylester II :
74 % aus der Säure I, Fp. 108-109°,

Δ^5-16.17-Seco-androstentriol-(3β,16,17) III :
68 % aus dem Ester II, Fp. 193°.

Die anschließende Oxydation nach Oppenauer zu Δ^4-16.17-Seco-androstenon-(3)-diol-(16,17) IV verlief nur mit einer Ausbeute von ca. 20 %.

Die Chlorierung der Substanz IV mit Oxalylchlorid gelang nicht.

Der zweite Syntheseweg über den Tosylester VI, den i-Äther VII und das i-Diol VIII bis zum Cl-diol XI verlief glatt.

Ausbeute Δ^5-3β- Hydroxyätiobiliensäure-dimethylester-tosylat-(3) VI :
93 % aus dem Ester II, Fp. 128-132°,

$\Delta^{3,5}$-Hydroxyätiobiliensäure-dimethylester-(6)-isomethyläther VII :
die Substanz ließ sich nicht kristallisieren und wurde daher gleich weiter mit $LiAlH_4$ reduziert,

$\Delta^{3,5}$-16.17-Seco-androstendiol-(16,17)-(6)-isomethyläther VIII :
69 % aus dem Tosylester VI, Fp. 168-169°.

Die Chlorierung von Substanz VIII mit Thionylchlorid unter Zusatz von Ca-carbonat verlief glatt. Die Substanzen IX $\Delta^{3,5}$-16.17-Seco-chlor-(16)-androstenol-(17)-isomethyläther-(6) und X Δ^5-16.17-Seco-chlor-(16)-androstendiol-(3β,17)-diacetat zeigten schlechte Kristallisationseigenschaften, daher wurde gleich Substanz XI, Cl-diol, dargestellt.

Ausbeute Δ^5-16.17-Seco-(16)-chlor-androstendiol-(3β,17) XI :
32 % aus i-Diol VIII, Fp. 153°.

Die Chlorierung des i-Diols VIII mit Oxalylchlorid oder mit Thionylchlorid ohne Ca-carbonat-Zusatz führte zu keinem Erfolg.

Es wurde versucht, durch eine Oxydation nach Oppenauer aus dem Cl-diol XI das Δ^4-16.17-Seco-(16)-chlor-androstenon-(3)-ol-(17) V darzustellen, die Oppenauer-Oxydation ergab ein Produkt, das praktisch kein Chlor mehr enthielt.

Auch eine Umsetzung des i-Diols VIII mit PBr_3 führte zu keinem Erfolg. Sowohl die Bromierung in Pyridin als auch in Benzol, teilweise unter Zugabe von Ca-carbonat, führte zu einem Reaktionsprodukt, in dem sich praktisch kein Brom nachweisen ließ.

Ein Austausch von Chlor im Cl-diol XI durch Jod gelang nicht. Auch nach langem Kochen des Cl-diols mit einem Überschuß an NaJ in Cyclopentanon fand sich in dem in Petroläther löslichen Reaktionsprodukt, das einen Fp. von 50° aufwies und schlechte Kristallisationseigenschaften zeigte, praktisch kein Jod.

Die östrogene Wirksamkeit folgender Substanzen wurde mit dem Allen-Doisy-Test geprüft:

III Δ^5-16.17-Seco-androstentriol-(3β,16,17) (Triol)
VIII $\Delta^{3,5}$-16.17-Seco-androstendiol-(16,17)-isomethyläther-(6) (i-Diol)
XI Δ^5-16.17-Seco-chlor-(16)-androstendiol-(3β,17) (Cl-diol)

Die folgende Tabelle gibt die Einzelheiten an.

Tabelle 1: Allen-Doisy-Test

Substanz	Dosis/Tier in γ	Anzahl der injiz. Tiere	Anzahl der Tiere mit aufgetretenem Östrus
Triol III	3 x 1000	4	0
i-Diol VIII	3 x 1000	4	0
Cl-diol XI	3 x 1000	4	1

Nur das Δ^5-16.17-Seco-chlor-(16)-androstendiol-(3β,17) XI zeigt also eine ganz schwache östrogene Wirksamkeit.

In der folgenden Tabelle sind die geprüften Substanzen, ihre Dosis und die Ergebnisse des Kükenkamm-Tests wiedergegeben.

Tabelle 2: Kükenkamm-Test

Substanz	Dosis/Tier in γ	Anzahl der Tiere	Gewicht der Tiere Beginn	Gewicht der Tiere Ende	Gewicht d. Kammes
Kontrollen	-	2	45 g	71 g	2o mg
Triol III	8 x 5oo	2	43 "	77 "	26 "
Cl-diol XI	8 x 5oo	2	49 "	81 "	29 "
Testosteron	8 x 5	2	46 "	8o "	134 "

Nur die Tiere, die Testosteron erhielten, wiesen deutlich vergrößerte Kämme auf. Alle anderen Substanzen zeigten bei dieser Testierungsmethode keine androgene Wirksamkeit.

Die zweite androgene Testierung an infantilen Rattenmännchen umfaßte die Substanzen, die in der folgenden Tabelle angegeben sind.

Tabelle 3: Test an infantilen Rattenmännchen

Substanz	Dosis in γ/Tier	Anzahl der Tiere
Triol III	8 x 2ooo	2
i-Diol VIII	8 x 3ooo	2
Cl-diol XI	8 x 15oo	2
"	8 x 3ooo	2
"	8 x 5ooo	2
Testosteron + Cl-diol XI	8 x 2oo + 25oo	2
Testosteron	8 x 2oo	2

Die Tiere, die die Substanzen Triol III, i-Diol VIII und Cl-diol XI erhalten hatten, besaßen infantile Samenblasen mit kubischem, inaktivem Epithel. Nur die Rattenmännchen, denen Testosteron - allein oder in Verbindung mit Cl-diol XI - verabreicht worden war, zeigten deutlich vergrößerte Samenblasen, die bei histologischer Untersuchung ein zylindrisches Epithel mit merklicher Aktivität erkennen ließen.

Die Substanzen III = Δ^5-16.17-Seco-androstentriol-(3β,16,17), VIII = $\Delta^{3,5}$-16.17-Seco-androstendiol-(16,17)-isomethyläther-(6) und XI = Δ^5-16.17-Seco-chlor-(16)-androstendiol-(3β,17) besitzen also keine

androgene Aktivität. Wird Cl-diol XI zugleich mit Testosteron verabreicht, bleibt die Testosteron-Wirkung bestehen, eine Hemmwirkung kommt dieser Substanz demnach nicht zu.

Diskussion

Die östrogene Wirksamkeit einer Substanz ist nicht an eine intakte Steroid-Struktur gebunden, da Verbindungen wie die Doisynolsäure oder Bisdehydrodoisynolsäure (1), die daraus hergestellten Aldehyde und Carbinole (2) oder auch Stilböstrol und Hexöstrol sowie zahlreiche weitere synthetische Östrogene eine hohe östrogene Aktivität aufweisen.

Die von Heer und Miescher beschriebenen "Perhydrodoisynolsäuren" (3) sind östrogen wie androgen unwirksam. Auch die von A. Hillmann (4) dargestellten Steroide mit offenem D-Ring zeigen keine androgene Aktivität.

Die androgene Wirksamkeit ist - im Gegensatz zu der östrogenen - zweifellos sehr spezifisch und findet sich in ausgeprägtem Maße bei Substanzen, die das intakte Cyclopentano-perhydrophenanthren-Skelett aufweisen. Allerdings wurden aus Harn auch wirksame Steroide mit einem sechsgliedrigen Ring D - D-Homosteroide - isoliert (17). Synthetische Verbindungen wie Methyltestosteron und Äthinyltestosteron zeigen - besonders nach peroraler Verabreichung - androgene Wirksamkeit (18).

Das Δ^5-16.17-Seco-chlor-(16)-androstendiol-(3β,17) ist im Samenblasen- und Kükemkamm-Test unwirksam, es besitzt lediglich eine sehr schwache östrogene Aktivität. Es ergibt sich also, daß die Einführung von Chlor keine Verbesserung der androgenen Aktivität bewirkt, dagegen sind peroral wirksame Verbindungen bekannt, die - wie die hochwirksamen Fluorcorticoide - in 9-Stellung ein Fluor-Atom tragen (18).

Zusammenfassung

Es wurde versucht, halogenierte Steroidderivate mit offenem D-Ring, die in ihrer Struktur mit dem Testosteron verglichen werden können, zu synthetisieren.

Als Ausgangsmaterial diente die Δ^5-3β -Hydroxyätiobiliensäure.

Die Herstellung eines Δ^4-16.17-Seco-chlor-(16)-androstenon-(3)-ol-(17) gelang jedoch nicht.

Das Δ^5-16.17-Seco-chlor-(16)-androstendiol-(3β,17), welches über den $\Delta^{3,5}$-16.17-Seco-androstendiol-(16,17)-isomethyläther-(6) hergestellt wurde, wies keine androgene Wirkung auf und zeigte im Allen-Doisy-Test nur eine schwache östrogene Wirkung.

Aus den Untersuchungen ergibt sich, daß für die androgene Wirksamkeit ein intakter D-Ring im Steroid-Molekül notwendig ist.

Literatur

1) K. Miescher u. R. Rometsch: Helv. chim. Acta 29:1231 (1946)

2) K. Miescher u. J. Heer: Helv. chim. Acta 3o:777 (1947)

3) J. Heer u. K. Miescher: Helv. chim. Acta 3o:786 (1947)

4) A. Hillmann: Z. f. Naturforsch. 1o b:36o (1955)

5) Kuwada: Chem. Abstr. 31:2224 (1937)

6) A. Wettstein, H. Fritsche, F. Hunziker u. K. Miescher: Helv. chim. Acta 24:353 E (1941)

7) C. von Seemann u. G.A. Grant: J. Am. Chem. Soc. 72:4o73 (195o)

8) K. Miescher u. A. Wettstein: Helv. chim. Acta 22:1262 (1939)

9) Girard: Helv. chim. Acta 19:1o98 (1936)

1o) R.M. Dodson u. B. Riegel: J. Org. Chemistry 13:424 (1948)

11) W. Stoll: Z. physiol. Chem. 2o7:147 (1932)

12) I. Grob u. W.A. Goldberg: Helv. chim. Acta 32:184 (1949)

13) Allen u. Doisy: J. Am. Med. Ass. 81:819 (1923)

14) R.T. Frank, E. Klempner, F. Hollander u. B. Kriss: Zusammenfassung in Endocrinology 31:63 (1942)

15) T.F. Gallagher u. F.C. Koch: J. Pharmacol. & Exper. Therap. 4o:327 (193c

16) A.E. Rakoff, K.E. Paschkis u. A. Cantarow: Proc. Soc. Exper. Biol. Med 55:124 (1944)

17) W. Klyne:Nature 166:559 (195o)

18) Th. Bersin: Biochemie der Hormone, Leipzig 1959, S. 181-183

Teil III

Untersuchungen über die in-vitro-Wirkungen von Thyreoidea-Hormonen und Thyreoidea-Hormon-Derivaten

Einleitung

Die Thyreoidea-Hormone beeinflussen eine große Zahl von Stoffwechselvorgängen im Organismus. Die bei Unterfunktion der Schilddrüse auftretenden Symptome, die sich unter anderem in einer Einschränkung sämtlicher Stoffwechselvorgänge, auch des Gehirns, manifestieren, lassen sich durch Verabreichung von Thyreoidea-Hormonen weitgehend zum Verschwinden bringen (1, 2).

Die Zufuhr von Thyreoidea-Hormon bewirkt eine Stoffwechselsteigerung mit erhöhtem Sauerstoffverbrauch ohne wesentliche Änderung des respiratorischen Quotienten. Alle Arten von Nahrungsstoffen werden rascher verwertet. Der Proteinstoffwechsel wird stimuliert. Außerdem bewirkt die Zufuhr von Thyreoidea-Hormon eine Senkung des Fett-, Lipoprotein- und Cholesterinspiegels sowie eine starke Abnahme des Körperfettes. Weiterhin bestehen Beziehungen zwischen der Schilddrüsenfunktion und der Funktion des Zentralnervensystems, des Tonus der Herzmuskulatur und der Funktion der Nebennierenrinde, auf die im einzelnen nicht eingegangen werden soll.

Die Entwicklung der Amphibien wird durch Verabreichung von Thyreoidea-Hormonen beeinflußt. Während geringe Dosen die Umwandlung von Kaulquappen beschleunigen, wobei sich normale, allerdings kleinere Tiere entwickeln, führen hohe Gaben von Thyreoidea-Hormonen zu einer überstürzten Metamorphose, bei der nicht lebensfähige Tiere entstehen (3).

Im Verlauf des letzten Jahrzehntes wurde versucht, den Wirkungsmechanismus der Thyreoidea-Hormone zu erklären. Neben verschiedenen Theorien fanden besonders die von Lardy (4) und Martius (5) Beachtung, daß die Thyreoidea-Hormone die Stoffwechselgeschwindigkeit dadurch regeln, daß sie den Wirkungsgrad der oxydativen Phosphorylierungen in der Zelle beeinflussen.

Martius fand (6), daß bei Mitochondrien von Vitamin K-frei ernährten Ratten eine normale Phosphorylierung erst eintritt, wenn K-Vitamine zugesetzt werden. Aus Schweineleber-Mitochondrien wurde ein Enzym - Phyllochinon-Reduktase - isoliert, das den Wasserstoff vom reduzierten Diphosphopyridinnucleotid auf Phyllochinon (Vit. K_1) in Gegenwart von anorganischem Phosphat und Phosphatakzeptoren überträgt. Das reduzierte Vitamin K_1 wird durch Cytochrom b reoxydiert. Damit wurde ein Glied der Atmungskette gefunden, bei dem der Reaktionsablauf mit der Bildung energiereichen Phosphats gekoppelt ist. Durch "entkoppelnde"Reagentien wie Thyroxin wird die Phyllochinon-Reduktase gehemmt. Durch Entkopplung der Atmungsketten-Phosphorylierung wird die Synthese energiereicher Phosphatbindungen gehemmt.

Es ist eingewendet worden (7), daß es schwer einzusehen ist, daß das Thyreoidea-Hormon seine Wirkung durch Vergiftung eines für die normalen physiologischen Vorgänge notwendigen Enzymsystems erreicht. Martius hat die Annahme gemacht, daß es sich möglicherweise um eine Dosierungsfrage handelt.

Mit der Theorie von Martius und Lardy lassen sich zwar die Erscheinungen der Hyperthyreose erklären, aber nicht die spezifischen Restitutionswirkungen der Thyreoidea-Hormone bei Myxoedem, denn Dinitrophenol, das eine besonders hohe "entkoppelnde" Wirkung hat, besitzt keine Thyreoidea-Hormon-Aktivität.

Der Arbeitskreis von Lehninger (8) stellte fest, daß Jodthyronine eine Quellung an isolierten Mitochondrien bewirken, die Ausdruck einer "Mechano-Enzym-Funktion" sein soll. Durch diesen Effekt auf die Struktur könnten die Jodthyronine Enzymsysteme beeinflussen.

Während die Applikation von Thyreoidea-Hormonen am Ganztier zu stets

reproduzierbaren Stoffwechseleffekten führt, haben sich bei in-vitro-Untersuchungen an isolierten Organen bzw. Gewebsschnitten bisher keine eindeutigen Stoffwechseleffekte gezeigt. Die Gewebsschnitte von hyperthyreotischen Tieren zeigen durchweg eine erhöhte Atmung, aber die Zugabe von Thyreoidea-Hormonen zu Gewebsschnitten euthyreotischer Tiere führte in vitro nicht zu einer Erhöhung des Sauerstoffverbrauchs. Die Thyreoidea-Hormone weisen bei in-vivo-Untersuchungen meist eine Latenzzeit von mindestens 4 Stunden auf, nach der Effekte zu beobachten sind. Nach Untersuchungen von Donhoffer und Mitarbeitern (9) kann die Wirkung von Thyreoidea-Hormonen auf den Sauerstoffverbrauch in Beziehung zu weiteren endokrinen Organen gesetzt werden. Bei hypophysektomierten Ratten konnte durch die intravenöse Verabreichung von Trijodthyronin ein Anstieg des Sauerstoffverbrauchs innerhalb 1 Stunde erreicht werden, der durch die zusätzliche Gabe von ACTH oder Cortison verhindert wurde.
In den letzten Jahren fanden Befunde von Pitt-Rivers (1o) besondere Beachtung, nach denen eine sofortige stimulierende Wirkung von Trijodthyreoessigsäure (Triac.) und Tetrajodthyreoessigsäure (Tetrac.) auf den Stoffwechsel thyreoidektomierter Ratten eintrat. In vitro erfolgte ein sofortiger Anstieg des Sauerstoffverbrauchs von Leber- und Nierenschnitten dieser Tiere. Diese Ergebnisse konnten jedoch von anderen Autoren nicht bestätigt werden.
Weiterhin fanden Pitt-Rivers und Mitarbeiter (11), daß die aerobe Glycolyse von Ascites-Tumorzellen durch Zugabe von Triac. und Tetrac. erhöht war, ebenso durch Zusatz von Dinitrophenol (DNP), jedoch nicht Trijodthyronin (TITh). Die anaerobe Glycolyse von Ascites-Tumorzellen wurde in geringerem Umfang durch Zugabe von Triac. ebenfalls erhöht. In geringen Dosen stimulierte Triac. auch den Sauerstoffverbrauch der Asciteszellen, dagegen wirkten höhere Dosen hemmend.

Die nachfolgenden Untersuchungen hatten den Zweck, den Einfluß verschiedener Jodthyronine und deren Derivate im Vergleich mit Dinitrophenol auf den Stoffwechsel von Mäusediaphragmen und Ehrlich-Ascites-Tumorzellen unter verschiedenen Bedingungen zu prüfen.

Mäusediaphragmen zeigen Vorteile gegenüber Organschnitten, da das Organ weitgehend erhalten ist und eine Dicke aufweist, die Warburgs Forderungen für die Bedingungen bei Stoffwechsel-Untersuchungen in vitro entspricht. Zum Vergleich sollten noch Mäuse-Duodenum und -Rectum auf ihre Verwendung für in-vitro-Untersuchungen geprüft werden.

Es sollte der Einfluß der Jodthyronine, deren Derivate und Dinitrophenol untersucht werden:

a) auf die Atmung durch manometrische Messung des Sauerstoffverbrauchs,

b) auf die Bildung der Milchsäure,

c) auf die Änderung der Glucose-Konzentration während der Inkubationsdauer,

d) auf die für den Stoffwechsel wichtigen Ionenveränderungen, teilweise unter Verwendung von ^{45}Ca,

e) auf den Phosphat-Stoffwechsel, wobei teilweise ^{32}P verwendet wurde.

Experimenteller Teil

Die Untersuchungen wurden durch Inkubationen von Geweben verschiedener Provenienz in verschiedenen Pufferlösungen durchgeführt. Dabei kamen zur Verwendung: Diaphragmen, daneben auch zum Vergleich Duodenum und Rectum von normalen Mäusen und Diaphragmen hypothyreotischer Mäuse. Ferner wurden Untersuchungen mit Suspensionen von Ehrlich-Ascites-Tumorzellen in verschiedenen Medien durchgeführt.

Als normale Mäuse wurden erwachsene Weibchen im Gewicht von ca. 25 g verwendet.

Hypothyreotische Tiere wurden erhalten, indem normale Mäuseweibchen je Tier eine einmalige Injektion von loo μC ^{131}J in 0,1 ml physiol. NaCl-Lösung intraperitoneal bekamen. Ca. 5 Wochen nach der Injektion wurden die Tiere verwendet.

Die Mäuse wurden durch Nackenschlag getötet, die Diaphragmen oder auch Duodenum oder Rectum schnell herauspräpariert, ganz kurz in Ringer-Lösung abgespült, abgetrocknet und auf einer Torsionswaage gewogen. Dann wurden die Organe entweder sofort in die Warburg-Kölbchen mit der Inkubationslösung, die Zusätze von Thyreoidea-Hormonen oder Hormonderivaten und daneben noch teilweise ^{32}P enthielt, gegeben oder vorher - wie angegeben - präinkubiert.

Für die einzelnen Inkubationsansätze wurden 1, 2 oder 5 Diaphragmen verwendet. Bei den Ansätzen wurde die Menge an Inkubationsflüssigkeit so bemessen, daß pro Diaphragma 2 ml Flüssigkeit verwendet wurde.

Die Inkubationsversuche erfolgten mit der Warburg-Apparatur der Firma Braun, Melsungen. Die Kölbchen wurden bei 38° nach der üblichen Methodik geschüttelt, entweder anaerob nach Einleiten von Stickstoff oder aerob. Die Messung des Sauerstoffverbrauchs erfolgte in der üblichen Weise (12).

Nach der Inkubation, deren Dauer meist 9o Minuten betrug, wurden die Diaphragmen ganz kurz in eiskaltem 5o %igem Aceton gewaschen, um die Radioaktivität des Inkubationsmediums von der Diaphragmaoberfläche zu entfernen, und in kalter konz. Ameisensäure gelöst.
Anschließend wurden aus der Inkubationsflüssigkeit und der HCOOH-Lösung der Diaphragmen die später beschriebenen Bestimmungen durchgeführt.

Um Asciteszellen-Suspensionen zu gewinnen, wurden erwachsene Mäuseweibchen mit 0,4 ml Asciteszellen-Suspension i.p. geimpft, lo Tage nach dem Überimpfen getötet und die Tumorzellen-Suspension durch Punktion entnommen.
Die Zellsuspension wurde entweder direkt verwendet, wobei die Suspension mit zellfreier Ascites-Flüssigkeit verdünnt wurde, oder bei 2-5° bei 3ooo U/min zentrifugiert und die Zellen in den angegebenen Lösungen mit Zusätzen an Thyreoidea-Hormonen oder Derivaten nach der oben angegebenen Methodik inkubiert.
Anschließend wurde eine abgemessene Menge Zellsuspension aus jedem Kölbchen entnommen, bei 2-5° und 3ooo U/min zentrifugiert und die Zellen mit 5 %iger eiskalter Trichloressigsäure ca. 18 Stunden extrahiert.
Aus der Inkubationsflüssigkeit und dem Trichloressigsäure-Extrakt der Zellen wurden die unten angegebenen Bestimmungen vorgenommen.

Als Inkubationsmedien wurden folgende Lösungen benutzt:

a) Ringer-Lösung mit der Zusammensetzung (13):

9,o g NaCl
0,42 " KCl
0,24 " $CaCl_2$ in 1ooo ml H_2O,
0,025 " $MgCl_2$
0,5 " $NaHCO_3$

die 2oo mg% Glucose und 10^{-3}m Phosphat und teilweise noch isotonische $MgCl_2$-Lösung enthalten konnte.

b) eine Kalium-reiche Lösung, die aus isotonischen Lösungen folgender Zusammensetzung bestand (Änderungen werden extra angegeben):

18o ml	0,95 % NaCl	11 ml	5,4 % Glucose
9o "	1,22 " KCl	25 "	1,33 " $NaHCO_3$
4 "	1,29 " $CaCl_2$	3 "	4,63 " $Na_2HPO_4 \cdot 12\ H_2O$
4 "	1,o7 " $MgCl_2$		

c) Tyrode-Lösung (13)

Lösung I	2o,o % NaCl	Lösung II	5,o % $NaHCO_3$
	0,5 " KCl		0,25 " Na_2HPO_4
	0,5 " $CaCl_2$		
	0,25 " $MgCl_2$		

2 l Tyrode: 8o ml Lös. I auf looo ml verdünnt,
+ 4o " Lös. II " looo " verdünnt,
+ 2 g Glucose.

d) zellfreie Ascites-Flüssigkeit, die durch Zentrifugation aus Tumorzellen-Suspension gewonnen wurde.

e) Mäuse-Serum bzw. Rattenserum.
Durch Herzpunktion gewonnenes Mäuse- oder Rattenblut wurde schonend zentrifugiert, um die sehr leicht eintretende Hämolyse möglichst zu vermeiden.

Zu den Inkubationsflüssigkeiten wurden die nachfolgenden Thyreoidea-Hormone oder Hormonderivate dazugegeben:

L-Trijodthyronin (TITh),
Dinitrophenol (DNP),
Tetrajodthyreoessigsäure (Tetrac.),
Thyroxamin (Tx-am.),
L-Thyroxin (L-Tx),
D-Thyroxin (D-Tx).

Die Substanzen TITh, Tx-am. und L-Tx wurden in einer Konzentration von 10^{-3}m in verdünnter HCl/Propylenglykol, Tetrac. und D-Tx in verd. NaOH/Propylenglykol und DNP in H_2O/Propylenglykol gelöst und auf pH 6 gebracht. Diese Lösungen wurden mit H_2O/Propylenglykol auf 10^{-5}m verdünnt.

Die Endkonzentration betrug bei den Untersuchungen an Diaphragmen meist 10^{-7}m, bei denen an Tumorzellen 10^{-6}m.

Aus den Inkubationsflüssigkeiten und den Diaphragma- und Tumorzellen-Extrakten wurden folgende Bestimmungen durchgeführt:

1) Phosphatbestimmung nach Martin und Doty (14) in einer Variation nach Weil-Malherbe und Green (15), bei der nur freies Phosphat erfaßt wird,
2) Kalium,Natrium und Calcium mit dem Flammenphotometer,
3) Magnesium mit der Titangelb-Methode, variiert nach Orange und Rhein (16),
4) Milchsäure nach Bruns (17) mit der Testkombination Nr. TC-B 15972 der Firma Boehringer, Mannheim,
5) Brenztraubensäure nach Bücher (18) mit der Testkombination Nr. TC-C 15973 der Firma Boehringer, Mannheim,
6) Glucose (19) mit der Testkombination Nr. TC-M 15983 der Firma Boehringer, Mannheim.

Für einige Untersuchungen wurden ^{32}P und ^{45}Ca verwendet, die wie das zur Thyreoidektomie der Mäuse benutzte ^{131}J von A.E.R.E. Radiochem. Center Amersham, England, bezogen wurden.

Einigen Inkubationsansätzen für Diaphragmen oder Asciteszellen wurde ^{32}P-Lösung in geringer Menge zugesetzt, für einige weitere Untersuchungen wurden Tumorzellen verwendet, die in vivo markiert waren. Hierzu erhielten Tumormäuse ca. 3 Std. vor der Punktion eine Injektion von 5o μC ^{32}P-Lösung subk., die so markierten Tumorzellen wurden vor der Inkubation mehrmals in ^{32}P-freier Ascites-Flüssigkeit gewaschen.

Die spezifische Radioaktivität des freien Phosphats in den Diaphragmen S_D, bzw. in den Tumorzellen S_Z sowie die spezifische Radioaktivität des freien Phosphats im Inkubationsmedium S_M wurde durch Auszählen der bei der Phosphatbestimmung erhaltenen Isobutanol-Benzol-Extrakte im Flüssigkeitszählrohr mit dem Zählgerät FH 9C der Firma Frieseke und Höpfner bestimmt.

Aus der Bestimmung des Quotienten S_D/S_M bzw. S_Z/S_M ergibt sich ein Einblick in die Dynamik des Phosphat-Stoffwechsels.

Ebenso wurde einigen Inkubationsansätzen ^{45}Ca zugesetzt und nach der Inkubation die spezifische Radioaktivität der Diaphragma-Extrakte S_D und die spezifische Radioaktivität des Inkubationsmediums S_M bestimmt. Hierzu wurden ^{45}Ca-haltige Lösungen in genau abgemessener Menge streifenförmig auf Chromatographiepapier 2o43 b mgl. der Firma Schleicher & Schüll aufgetragen und die Radioaktivität mit dem Radiochromatographen der Firma Frieseke und Höpfner gemessen. Der Quotient S_D/S_M erlaubt einen Einblick in den Calcium-Austausch.

Ergebnisse

Die Inkubationsansätze, bei denen die Wirkungen von Thyreoidea-Hormonen oder Hormonderivaten geprüft wurden, bezogen sich auf folgende Organe:

A) Diaphragmen normaler und hypothyreotischer Mäuse,

B) Diaphragmen, Duodenum und Rectum normaler Mäuse,

C) Suspensionen von Ehrlich-Ascites-Tumorzellen.

A) Inkubationsversuche mit Mäusediaphragmen

Die in-vitro-Untersuchungen bezogen sich auf den Stoffwechsel von Diaphragmen normaler und hypothyreotischer Tiere bei aerober und anaerober Inkubation in verschiedenen Medien.

Im einzelnen wurden geprüft:

1) Diaphragmen normaler und thyreoidektomierter Mäuse nach aerober und anaerober Inkubation in Ringer-Glucose-Phosphat-Lösung,

2) Verhalten normaler Mäusediaphragmen nach aerober Inkubation in verschiedenen Medien,

3) Diaphragmen normaler und hypothyreotischer Mäuse nach anaerober Inkubation in einem aus isotonischen Lösungen zusammengesetzten Medium,

4) Diaphragmen normaler und hypothyreotischer Mäuse nach Inkubation in Ascites-Flüssigkeit und Serum,

5) Diaphragmen normaler Mäuse nach aerober Inkubation in einer ^{45}Ca-haltigen Ringer-Glucose-Lösung.

A 1) Aerobe und anaerobe Inkubation von Diaphragmen normaler und hypothyreotischer Mäuse in Ringer-Glucose 2oo mg%-Phosphat 10^{-3}m-Lösung, die 3 ml isot. $MgCl_2$-Lösung auf loo ml enthielt (siehe Lösung a).

Tabelle 1 Diaphragmen normaler Mäuse

a) Bestimmung aus dem Medium

Medium: Ringer-Glucose-Phosphat + 1 µC ^{32}P

Inkubationsdauer: 9o min. aerob.

Pro Kölbchen 5 Diaphragmen in lo ml Lös.

Zusätze 10^{-7}m

Präinkubation: 2o min. in eiskalter Lös.

	O_2-Verbr. µMol/g/h	P	K	Na	Ca	Mg	Milchs. µMol/g/h	S_D/S_M
				mg%				
Medium	-	2,84	21,9	355	5,o	lo,3	-	-
Kontrollen	13,5	4,o	24,4	38o	4,45	lo,9	13,1	o,539
TITh	11,1	4,44	23,2	379	5,o	lo,6	15,9	o,556
DNP	17,o	3,72	23,2	372	6,4	lo,6	15,4	o,513
Tetrac.	15,6	3,84	24,o	372	4,1	lo,3	14,7	o,675

b) Bestimmung aus den Diaphragmen

	P	K	Na	Ca	Mg
		γ/loo mg			
Kontrollen	9,8	32	248	75	24
TITh	9,9	3o	233	75	23
DNP	lo,4	35	255	75	25
Tetrac.	8,9	31	234	74	21

Tabelle 2 Diaphragmen normaler Mäuse

a) Bestimmungen aus dem Medium

Medium: Ringer-Glucose-Phosphat + 1 μC ^{32}P

Inkubationsdauer: 9o min. anaerob

Pro Kölbchen 5 Diaphragmen in lo ml Lös.

Zusätze 10^{-7} m

Präinkubation: 2o min. in eiskalter Lös.

	P	K	Na	Ca	Mg	Milchs.	S_D/S_M
			mg%			μMol/g/h	
Medium	2,85	21,9	365	4,5	8,85	-	-
Kontrollen	4,64	25,3	376	4,7	8,7	7,2	o,557
TITh	4,68	24,8	358	4,o	8,65	8,6	o,442
DNP	4,74	24,3	354	3,9	8,7	11,6	o,485
Tetrac.	4,44	25,9	372	5,1	9,1	7,6	o,467

b) Bestimmungen aus den Diaphragmen

	P	K	Na	Ca	Mg
			γ/100 mg		
Kontrollen	4,5	29	254	31	23
TITh	4,3	27	244	44	26
DNP	4,4	26	238	32	25
Tetrac.	4,2	27	24o	42	27

Tabelle 3 Diaphragmen hypothyreotischer Mäuse

a) Bestimmungen aus dem Medium

Medium: Ringer-Glucose-Phosphat + 1 μC ^{32}P

Inkubationsdauer: 9o min. aerob

Pro Kölbchen 5 Diaphragmen in 1o ml Lös.

Zusätze 10^{-7}m

Präinkubation: 2o min. in eiskalter Lös.

	O_2-Verbr. μMol/g/h	P	K	Na	Ca	Mg	Milchs. μMol/g/h	S_D/S_M
				mg%				
Medium	-	2,36	21,8	341	3,7	9,4	-	-
Kontrollen	18,o	5,24	27,6	342	4,o5	9,8	14,2	o,243
TITh	15,9	5,16	28,1	336	4,o	9,6	1o,4	o,325
DNP	18,o	5,o4	27,8	342	3,9	9,4	12,3	o,332
Tetrac.	21,9	5,16	27,6	35o	4,1	9,6	13,5	o,236

b) Bestimmungen aus den Diaphragmen

	P	K	Na	Ca	Mg
			γ/1oo mg		
Kontrollen	6,2	3o	223	27	19
TITh	6,1	29	217	21	21
DNP	6,2	31	224	47	21
Tetrac.	7,9	35	24o	28	21

Tabelle 4 Diaphragmen hypothyreotischer Mäuse

a) Bestimmungen aus dem Medium

Medium: Ringer-Phosphat + 1 µC ^{32}P (glucosefrei)

Inkubationsdauer: 9o min. aerob

Pro Kölbchen 5 Diaphragmen in lo ml Lös.

Zusätze 10^{-7} m

Präinkubation: 2o min. in eiskalter Ringer-Phosphat-Lös.

	O_2-Verbr. µMol/g/h	P	K	Na	Ca	Mg	Milchs. µMol/g/h	S_D/S_M
				mg%				
Medium	-	2,28	21,6	36o	4,o	7,7	-	-
Kontrollen	2o,8	5,76	3o,6	354	4,7	8,2	7,6	o,3
TITh	17,o	5,72	31,5	352	4,6	8,5	lo,2	o,335
DNP	2o,o	5,56	3o,3	356	4,55	8,2	6,1	o,316
Tetrac.	19,8	5,56	3o,o	358	4,4	8,2	8,9	o,313

b) Bestimmungen aus den Diaphragmen

	P	K	Na	Ca	Mg
			ɣ/loo mg		
Kontrollen	9,2	25	213	32	27
TITh	8,1	25	2o5	28	25
DNP	7,9	25	2o8	32	26
Tetrac.	8,o	25	2o5	36	25

Tabelle 5 Diaphragmen hypothyreotischer Mäuse

Untersuchungen des Mediums

Medium: Ringer-Glucose-Phosphat

Inkubationsdauer: 9o min. aerob

Pro Kölbchen 2 Diaphragmen in 4 ml Lös.

Zusätze 10^{-7}m

Präinkubation: 2o min. in eiskalter Lös.

	O_2-Verbr.	Milchs.	Brenzt.	Glucose
	µMol/g/h			mg%
Medium	-	-	-	178
Kontrollen	14,9	11,8	o,61	168
TITh	14,2	14,3	o,345	16o
DNP	13,1	11,6	o,4o5	163
Tetrac.	13,2	8,o	o,332	155

Tabelle 6 Diaphragmen hypothyreotischer Mäuse

Untersuchungen des Mediums

Medium: Ringer-Glucose-Phosphat

Inkubationsdauer: 9o min. anaerob

Pro Kölbchen 2 Diaphragmen in 4 ml Lös.

Zusätze 10^{-7}m

Präinkubation: 2o min. in eiskalter Lös.

	Milchs.	Brenzt.	Glucose
	µMol/g/h		mg%
Medium	-	-	18o
Kontrollen	12,5	o,42	165
TITh	17,8	o,219	168
DNP	13,9	o,312	17o
Tetrac.	11,3	o,294	155

Anschließend aus jedem Kölbchen die Hälfte der Lös. entnommen, frische Lös. mit Zusätzen dazugegeben, Inkubationsdauer: 9o min. aerob

	O_2-Verbr.	Milchs.	Brenzt.	Glucose
	µMol/g/h			mg%
Medium	-	-	-	175
Kontrollen	5,4	4,2	o,63	168
TITh	5,1	5,o	o,63	16o
DNP	5,4	3,9	o,785	16o
Tetrac.	4,5	2,2	o,495	165

A 2) Verhalten normaler Mäusediaphragmen nach aerober Inkubation in verschiedenen Medien.

Tabelle 7 Diaphragmen normaler Mäuse

Untersuchungen des Mediums

Inkubationsdauer: 9o min. aerob

pro Kölbchen 5 Diaphragmen in 1o ml Lös.

Präinkubation: 2o min. in eiskalter Ringer-Glucose-Phosphat-Lös.

Medium I : Ringer-Glucose 2oo mg%-Phosphat 10^{-3}m (2 ml isot. $MgCl_2$-Lös. auf 1oo ml)

Medium II : Ringer-Glucose 2oo mg%-Phosphat 10^{-3}m (3 ml isot. $MgCl_2$-Lös. auf 1oo ml)

Medium III: Zusammengesetzte Lös., siehe Lös. b (18o ml isot. KCl, 9o ml NaCl, 4 ml $MgCl_2$ ...)

Medium IV : Zusammengesetzte Lös., siehe Lös. b (18o ml isot. KCl, 9o ml NaCl, 1o ml $MgCl_2$...)

	O_2-Verbr. µMol/g/h	P	K	Na	Ca	Mg	Milchs. µMol/g/h
		mg%					
Medium I	-	2,84	21,3	33o	2,65	7,73	-
Diaphragmen	28,6	4,28	24,3	354	3,15	8,o	17,8
Medium II	-	2,4	21,6	362	3,85	9,9	-
Diaphragmen	2o,o	4,56	25,2	364	4,25	1o,4	1o,2
Medium III	-	1,48	387	154	2,5	4,o	-
Diaphragmen	18,1	3,64	387	154	3,5	4,53	32,9
Medium IV	-	0,96	384	144	3,75	11,4	-
Diaphragmen	13,7	3,6	369	154	4,5	11,9	13,2

Tabelle 8 Diaphragmen normaler Mäuse

Untersuchungen des Mediums

Medium: Ringer-Glucose-Phosphat $2 \cdot 10^{-3}$m (3 ml $MgCl_2$-Lös. auf 1oo ml)

Inkubationsdauer: 9o min. aerob

pro Kölbchen 5 Diaphragmen in 1o ml Lös.

Zusätze 10^{-7}m

Präinkubation: 2o min. in eiskalter Lös.

	O_2-Verbr. µMol/g/h	P	K	Na	Ca	Mg	Milchs. µMol/g/h
		mg%					
Medium	-	4,12	21,8	34o	2,3	1o,9	-
Kontrollen	3o,1	6,92	25,6	33o	3,5	11,1	26,1
DNP	26,2	6,96	25,o	344	3,2	11,o	16,1

Tabelle 9 Diaphragmen normaler Mäuse

Untersuchungen des Mediums

Medium: Ringer-Glucose-Phosphat-1,5 % Serumalbumin (3ml $MgCl_2$-Lös. auf loo ml)

Inkubationsdauer: 9o min. aerob

pro Kölbchen 5 Diaphragmen in lo ml Lös.

Zusätze 10^{-7}m

Präinkubation: 2o min. in eiskalter Ringer-Gl.-Phosphat-Los.

	O_2-Verbr. μMol/g/h	P mg%
Medium	-	2,67
Kontrollen	9,8	4,o
TITh	7,1	4,o
DNP	7,7	3,84
Tetrac.	6,o	4,o

Tabelle lo Diaphragmen normaler Mäuse

Untersuchungen des Mediums

Medium: Ringer-Glucose-Phosphat-7,5 % Periston (3 ml $MgCl_2$-Lös. auf loo ml)

Inkubationsdauer: 9o min. aerob

pro Kölbchen 2 Diaphragmen in 4 ml Lös.

Zusätze 10^{-7}m

nicht präinkubiert

	O_2-Verbr. μMol/g/h	P mg%
Medium	-	3,51
Kontrollen	21,9	5,76
TITh	23,1	6,64
DNP	22,2	6,76
Tetrac.	21,4	7,16

A 3) Anaerobe Inkubation von Diaphragmen normaler und hypothyreotischer Mäuse in einem aus isotonischen Lösungen zusammengesetzten Medium (siehe Lös. b).

Tabelle 11 Diaphragmen normaler Mäuse

Untersuchungen des Mediums
Medium: zusammengesetzte Lös. (siehe Lös. b)
Inkubationsdauer: 9o min. anaerob
pro Kölbchen 2 Diaphragmen in 4 ml Lös.
Zusätze 10^{-7} m
Präinkubation: 2o min. in eiskalter Lös.

	Milchs.	Brenzt.	Glucose	K	Na	Ca
	—— µMol/g/h ——		—— mg% ——			
Medium	-	-	175	193	276	4,25
Kontrollen	39,8	1,23	155	219	288	5,o5
TITh	33,6	1,23	158	2o3	273	4,85
DNP	35,1	1,13	158	213	283	5,45
Tetrac.	44,o	o,82`	148	2o7	274	5,5

Tabelle 12 Diaphragmen hypothyreotischer Mäuse

Untersuchungen des Mediums
Medium: zusammengesetzte Lös. (siehe Lös. b)
Inkubationsdauer: 9o min. anaerob
pro Kölbchen 2 Diaphragmen in 4 ml Lös.
Zusätze 10^{-7} m
Präinkubation: 2o min. in eiskalter Lös.

	Milchs.	Brenzt.	Glucose
	—— µMol/g/h ——		mg%
Medium	-	-	135
Kontrollen	14,2	o,5	12o
TITh	2o,7	o,6	133
DNP	2o,3	o,496	123
Tetrac.	23,7	o,773	128

Tabelle 13 Diaphragmen hypothyreotischer Mäuse

Untersuchungen des Mediums

Medium: zusammengesetzte Lös. + 1 μC ^{32}P

Inkubationsdauer: 9o min. anaerob

pro Kölbchen 2 Diaphragmen in 4 ml Lös.

Zusätze 10^{-7}m

Präinkubation: 2o min. in eiskalter Lös.

	P mg%	Milchs. μMol/g/h	Brenzt. μMol/g/h	S_D/S_M
Medium	2,91	-	-	-
Kontrollen	5,76	16,7	o,82	o,66
TITh	5,o4	6,7	o,376	o,52
DNP	5,o8	1o,2	o,59	o,6
Tetrac.	5,4	9,o	o,292	o,56
Tx-am.	5,4	2o,o	o,595	o,59

A 4) Inkubation von Diaphragmen normaler und hypothyreotischer Mäuse in Ascitesflüssigkeit und Serum.

Tabelle 14 Diaphragmen normaler Mäuse

Untersuchungen des Mediums

Inkubationsdauer: 9o min. aerob

pro Kölbchen 2 Diaphragmen in 4 ml Lös.

Präinkubation: 2o min. in eiskalter zusammenges. Lös.

Medium I : Zusammengesetzte Lös. (siehe Lös. b) + 1 μC ^{32}P

Medium II: Ascitesflüssigkeit + 1 μC ^{32}P

	P mg%	S_D/S_M
Medium I	2,35	-
Diaphragmen	4,56	o,42
Medium II	3,96	-
Diaphragmen	3,93	o,27

Tabelle 15 Diaphragmen normaler Mäuse

Untersuchungen des Mediums
Medium: Ascitesflüssigkeit + 1 μC ^{32}P
Inkubationsdauer: 9o min. aerob
pro Kölbchen 2 Diaphragmen in 4 ml Lös.
Zusätze 10^{-7}n
Präinkubation: 2o min. in eiskalter Ringer-Lös.

	O_2-Verbr. μMol/g/h	P	Milchs.	Brenzt.	S_D/S_M
			mg%		
Medium	-	5,2	66,4	o,718	-
Kontrollen	2o,3	6,o4	68,4	o,793	o,68
TITh	15,1	5,6	64,o	o,6o4	o,63
DNP	18,1	6,28	66,8	o,68	o,63

Tabelle 16 Diaphragmen normaler Mäuse

Untersuchungen des Mediums
Medium: Ascitesflüssigkeit + 1 μC ^{32}P
Inkubationsdauer: 12o min. aerob
pro Kölbchen 2 Diaphragmen in 4 ml Lös.
Zusätze 10^{-7}m
nicht präinkubiert

	O_2-Verbr. μMol/g/h	P	K	Na	Ca	Mg	S_D/S_M
				mg%			
Medium	-	5,9	3o,3	364	8,o	2,66	-
Kontrollen	25,1	9,3	46,2	357	7,4	3,18	o,85
TITh	24,5	9,1	44,1	357	7,2	3,11	1,193
DNP	27,3	8,95	44,1	358	7,3	2,66	1,345
Tetrac.	28,2	8,8	42,9	358	7,2	3,48	1,o67
Tx-am.	24,4	8,95	45,o	355	7,3	3,11	o,96

Tabelle 17 Diaphragmen normaler Mäuse

Untersuchungen des Mediums

Medium: Ascitesflüssigkeit

Inkubationsdauer: 9o min. anaerob

pro Kölbchen 1 Diaphragma in 2 ml Lös.

Zusätze 10^{-7}m

nicht präinkubiert

	P	Milchs.
	mg%	
Medium	5,5	21,1
Kontrollen	9,72	28,4
TITh	9,66	25,9
DNP	8,96	27,o
Tetrac.	9,9	25,6
Tx-am.	8,96	25,5

Tabelle 18 Diaphragmen hypothyreotischer Tiere

Untersuchungen des Mediums

Medium: Ascitesflüssigkeit + 1 $\mu C^{32}P$

Inkubationsdauer: 3 Std. anaerob

pro Kölbchen 2 Diaphragmen in 4 ml Lös.

Zusätze 10^{-6}m

nicht präinkubiert

	P	K	Na	Ca	Milchs.	S_D/S_M
			mg%			
Medium	4,64	23,8	349	8,8	66,o	-
Kontrollen	8,o8	36,3	328	6,7	69,6	o,545
TITh	8,56	39,o	338	6,4	78,8	o,612
DNP	8,44	37,5	34o	6,7	72,4	o,447
Tetrac.	8,16	39,6	34o	6,6	72,8	o,643
Tx-am.	9,12	39,9	34o	6,3	81,2	o,573

Tabelle 19 Diaphragmen normaler Mäuse

a) Untersuchungen des Mediums

Medium: Mäuseserum

Inkubationsdauer: 9o min. anaerob

pro Kölbchen 2 Diaphragmen in 2,7 ml Serum

Zusätze 10^{-6} m, nicht präinkubiert

	K	Na	Ca	Mg	Milchs.
			mg%		
Medium	36,o	327	8,35	3,3	27,3
Kontrollen	47,5	324	7,3	4,3	42,3
TITh	45,9	324	7,3	4,2	43,6
DNP	43,8	329	7,25	3,8	34,8
Tetrac.	44,7	323	6,85	4,6	41,8
Tx-am.	44,7	325	7,2	3,8	4o,o

b) Untersuchungen der Diaphragmen

	K	Na	Mg
	γ/1oo mg		
Kontrollen	3o,4	4oo	31
TITh	34,8	37o	43
DNP	31,o	399	41
Tetrac.	35,4	416	44
Tx-am.	35,1	4o8	36

Tabelle 2o Diaphragmen hypothyreotischer Ratten

a) Untersuchungen des Mediums

Medium: Rattenserum + 1 μC ^{32}P

Inkubationsdauer: 6o min. anaerob

pro Kölbchen 2 Diaphragmen in 7 ml Serum

Zusätze 10^{-6}m

Präinkubation: 4o min. in eiskalter Ringer-Glucose-Lös.

	P	K	Na	Ca	Mg	Glucose	Milchs.	S_D/S_M
				mg%			µMol/g/h	
Medium	6,2	17,4	333	6,1	2,53	156	-	-
Kontrollen	1o,5	29,2	329	5,9	3,o7	122	113	o,396
TITh	1o,4	28,4	322	5,5	2,93	116	119	o,538
DNP	1o,6	3o,6	312	5,8	3,o	1o6	177	o,361
Tetrac.	9,9	26,7	322	5,8	3,2	1o6	77,4	o,6o
Tx-am.	1o,8	29,9	3o4	5,6	3,27	112	94,5	o,496
L-Tx	1o,4	29,3	312	5,8	3,o	1o7	122	o,452

b) Untersuchungen der Diaphragmen

	P	K	Na	Ca	Mg
			γ/1oo mg		
Kontrollen	27	48	125	51	15
TITh	22	5o	128	48	15
DNP	26	51	118	35	16
Tetrac.	17	33	12o	33	11
Tx-am.	19	41	116	37	16
L-Tx	21	36	124	42	14

A 5) Aerobe Inkubation von Diaphragmen normaler Mäuse in ^{45}Ca-haltiger Ringer-Glucose-Phosphat-Lösung.

Tabelle 21 Diaphragmen normaler Mäuse

a) Untersuchungen des Mediums

Medium: Ringer-Glucose 2oo mg%-Phosphat 10^{-3}m (siehe Lös. a) + 1 µC ^{45}Ca

Inkubationsdauer: 3o min. aerob

pro Kölbchen 5 Diaphragmen in 1o ml Lös.

Zusätze 10^{-7}m

Präinkubation: 2o min. in eiskalter Lös.

	O_2-Verbr. µMol/g/h	K	Na	Mg	Ca	S_D/S_M
		mg%				
Medium	-	21,8	38o	o,32	4,35	-
Kontrollen	33,7	25,3	373	o,88	4,3	1,19
TITh	33,6	24,6	385	1,o	4,3	1,164
DNP	36,2	24,5	39o	1,o4	4,4	1,14
Tetrac.	32,2	25,7	378	o,99	4,3	1,33
Tx-am.	34,9	24,8	392	1,o	4,35	1,281

b) Untersuchungen der Diaphragmen

	K	Na	Mg	Ca
	γ/1oo mg			
Kontrollen	52	25o	13	29
TITh	51	24o	13	27
DNP	58	258	13	26
Tetrac.	53	247	14	27
Tx-am.	47	256	14	28

Tabelle 22 Diaphragmen normaler Mäuse

a) Untersuchungen des Mediums

Medium: Ringer-Glucose-Phosphat + 1 $\mu C^{45}Ca$

Inkubationsdauer: 9o min. aerob

pro Kölbchen 5 Diaphragmen in lo ml Lös.

Zusätze 10^{-7} m

Präinkubation: 2o min. in eiskalter Lös.

	O_2-Verbr. µMol/g/h	K	Na	Mg	Ca	Milchs. µMol/g/h	S_D/S_M
		mg%					
Medium	-	22,o	336	o,35	4,4	-	-
Kontrollen	25,1	24,6	353	o,77	4,45	lo,8	1,122
TITh	17;5	24,8	346	o,63	4,7	8,6	1,lo3
DNP	23,o	24,8	35o	o,88	4,6	11,8	o,963
Tetrac.	19,2	24,8	348	o,91	4,5	lo,6	1,lo5
Tx-am.	25,9	24,9	348	o,77	4,6	7,6	1,158

b) Untersuchungen der Diaphragmen

	K	Na	Mg	Ca
	γ/loo mg			
Kontrollen	45	323	13	34
TITh	39	338	13	35
DNP	43	337	13	38
Tetrac.	41	325	13	32
Tx-am.	43	324	14	33

B) Vergleichende Inkubationsversuche mit Diaphragma, Duodenum und Rectum normaler Mäuse.

Tabelle 23 Vergleich von Diaphragma und Rectum in Ringer-Gl-Phosphat

Untersuchungen des Mediums

Medium: Ringer-Glucose-Phosphat 10^{-3}m (lo ml $MgCl_2$-Lös. auf loo ml)

Inkubationsdauer: 9o min. aerob

pro Kölbchen 1 Diaphr. bzw. Rectum in 1,5 ml Lös.

Zusätze 10^{-7}m

nicht präinkubiert

	O_2-Verbr. µMol/g/h	P mg%
Medium	-	2,88
Diaphr.	35,o	6,44
" + DNP	28,8	7,o2
Rectum	7,9	4,2
" + DNP	7,3	4,64

Tabelle 24 Vergleich von Diaphragma und Rectum in Ascitesflüssigkeit

Untersuchungen des Mediums

Medium: Ascitesflüssigkeit

Inkubationsdauer: 9o min. aerob

pro Kölbchen 1 Diaphr. bzw. 1 Rectum in 1,5 ml Lös.

Zusätze 10^{-7}m

nicht präinkubiert

	O_2-Verbr. µMol/g/h	P mg%
Medium	-	5,35
Diaphr.	49,1	9,9
" + DNP	36,9	9,65
Rectum	27,4	7,9
" + DNP	22,7	8,o

Tabelle 25 Duodenum in Ringer-Glucose-Phosphat

Untersuchungen des Mediums

Medium: Ringer-Glucose-Phosphat 10^{-3}m (3 ml isot. $MgCl_2$-Lös. in 100 ml)

Inkubationsdauer: 90 min. aerob

pro Kölbchen 1 Duodenum in 4 ml Lös.

Zusätze 10^{-7}m

nicht präinkubiert

Medium	O_2-Verbr. µMol/g/h	P mg%
	-	2,46
Kontrollen	17,8	4,36
TITh	16,0	4,08
DNP	22,1	4,88

C) Inkubationsversuche mit Ehrlich-Ascites-Tumorzellen

Die Wirkung von Thyreoidea-Hormonen oder Hormonderivaten wurde in folgenden Inkubationsansätzen geprüft:

1) Aerobe Inkubation ohne Präinkubation,

2) Anaerobe Inkubation ohne Präinkubation,

3) Aerobe Inkubation nach Präinkubation,

4) Anaerobe Inkubation mit anschließender aerober Inkubation nach Präinkubation.

C 1) Aerobe Inkubation ohne Präinkubation

Tabelle 26

Untersuchungen des Mediums

Medium: Ascitesflüssigkeit

Inkubationsdauer: 6o min.

Anzahl der Zellen pro mm^3: 6o ooo

4 ml Suspension pro Kölbchen

Zusätze 10^{-6}m (Ausnahme Jodacetat 10^{-3}m)

	O_2-Verbr. µMol/h	P	K	Na	Ca	Mg	Milchs.
		mg%					
Medium	-	6,3	26,7	334	8,o	2,37	3o,2
Kontrollen	12,87	6,5	29,2	348	8,8	2,62	32,8
TITh	12,15	5,9	31,2	326	8,2	2,o8	-
DNP	13,27	6,4	32,4	351	11,o	2,67	29,3
Tx-am.	12,95	6,8	3o,6	332	8,4	2,25	27,5
Jodacetat	11,o7	6,8	34,2	348	8,2	3,33	29,3

Tabelle 27

Untersuchungen des Mediums

Medium: Zusammengesetzte Lös. (siehe Lös. b, 3 ml $MgCl_2$, 6 ml $CaCl_2$)

Inkubationsdauer: 6o min.

Anzahl der Zellen pro mm^3: 6o ooo

4 ml Suspension pro Kölbchen

Zusätze 10^{-6}m (Ausnahme Jodacetat 10^{-3}m)

	O_2-Verbr. µMol/h	P	K	Na	Ca	Mg	Milchs.
		mg%					
Medium	-	3,2	165	249	8,2	3,75	-
Kontrollen	9,2	3,2	-	258	-	4,o	28,3
TITh	8,6	2,9	169	247	11,1	4,83	31,4
DNP	9,15	3,3	166	252	11,7	4,25	29,8
Tx-am.	8,3	3,6	168	251	9,55	3,83	25,5
Jodacetat	5,13	3,o	172	26o	5,2	3,25	5,1

Tabelle 28

Untersuchungen des Mediums Medium: Ascitesflüssigkeit

Inkubationsdauer: 9o min.

Anzahl der Zellen pro mm^3: 34 ooo 4 ml Suspension pro Kölbchen

Zusätze 10^{-6} m

Zellen in vivo durch Injektion von ^{32}P-Lösung markiert

	O_2-Verbrauch μMol/h	%	P	K	Na	Ca	Mg	Milchs.	S_Z/S_M
					mg%				
Medium	-	-	6,32	42,o	348	1o,4	2,o	72,4	6,o9
Kontrollen	13,93	1oo	5,o9	32,4	334	9,5	1,87	65,2	2,35
TITh	16,25	117	5,35	36,6	33o	9,2	2,o7	6o,4	1,68
DNP	15,15	1o9	5,27	36,o	332	8,9	1,93	65,6	2,47
Tetrac.	13,93	1oo	5,79	36,9	33o	8,7	2,2	68,o	1,46
Tx-am.	12,7	91	5,79	36,3	363	8,9	2,4	68,4	1,8
L-Tx	15,4	111	5,62	36,9	328	8,6	2,2	63,2	1,76
D-Tx	14,44	1o4	5,7	36,3	326	8,5	2,26	65,4	2,o4

C 2) Anaerobe Inkubation ohne Präinkubation

Tabelle 29

Untersuchungen des Mediums

Medium: Tyrode-Lösung (siehe Lös. c)

Inkubationsdauer: 3o min.

Anzahl der Zellen pro mm^3: 86 ooo 4 ml Suspension pro Kölbchen

Zusätze 10^{-7} m

	K	Na	Ca	Mg	Milchs.
			mg%		
Medium	11,o	322	3,3	2,1	-
Kontrollen	29,4	346	3,4	2,1	31,2
TITh	27,9	324	3,o	2,5	29,1
DNP	29,4	322	2,9	2,1	28,1
Tetrac.	27,3	329	2,95	2,5	29,4
Tx-am.	28,5	33o	3,2	2,4	26,3

Tabelle 3o

Untersuchungen des Mediums

Medium: Zusammengesetzte Lösung (siehe Lös. b) + 1 μC ^{32}P

Inkubationsdauer: 9o min.

Anzahl der Zellen pro mm^3: 12o ooo 4 ml Suspension pro Kölbchen

Zusätze 10^{-7}m

	P	Milchs.	S_Z/S_M
	mg%		
Medium	4,3	-	-
Kontrollen	7,45	3o,9	o,178
TITh	7,8	3o,5	o,19
DNP	7,37	28,9	o,183
Tetrac.	7,55	3o,1	o,179
Tx-am.	7,55	31,1	o,172

Tabelle 31

Untersuchungen des Mediums

Medium: Ascitesflüssigkeit

Inkubationsdauer: 9o min.

Anzahl der Zellen pro mm^3: 66 7oo 2,5 ml Suspension pro Kölbchen

Zusätze 10^{-6}m

Zellen in vivo durch Injektion von ^{32}P-Lösung markiert

	P	K	Na	Ca	Mg	Milchs.	S_Z/S_M
	mg%						
Medium	8,86	55,8	318	9,5	1,93	64,6	7,52
Kontrollen	9,65	66,6	298	9,3	2,13	62,4	1,72
TITh	lo,18	64,2	284	7,5	2,4	6o,2	1,41
DNP	9,47	67,2	292	-	2,13	61,8	1,57
Tetrac.	lo,7	67,2	298	7,4	2,4	51,6	1,56
Tx-am.	lo,o	73,8	297	8,3	2,4	57,6	1,41
L-Tx	11,14	69,6	296	8,o	2,6	64,o	1,6o
D-Tx	lo,1	68,4	3oo	8,1	2,46	6o,8	1,51

C 3) Aerobe Inkubation nach Präinkubation

Tabelle 32

Untersuchungen des Mediums

Medium: Ascitesflüssigkeit

Präinkubation: 3,5 Std. aerob bei Zimmertemp. mit Zusätzen 10^{-6}m, anschließend in der Kälte zentrifugiert, Zellen in frischer Ascitesflüssigkeit suspendiert

Inkubationsdauer: 9o min. bei 38°

Anzahl der Zellen pro mm^3: 55 ooo 5 ml Suspension pro Kölbchen

	O_2-Verbrauch µMol/h	%	Milchs. mg%
Medium	-	-	64,o
Kontrollen	13,4	loo	62,o
TITh	16,4	122	6o,o
DNP	13,7	lo2	64,5
Tetrac.	13,7	lo2	61,o
Tx-am.	12,9	96	6o,5
L-Tx	15,7	117	59,5
D-Tx	14,3	lo7	6o,o

Tabelle 33

Untersuchungen des Mediums

Medium: Ascitesflüssigkeit

Präinkubation: 5 Std. bei Zimmertemp. mit Zusätzen 10^{-6}m, anschließend Zellsuspension mit Ascitesflüssigkeit verdünnt

Inkubationsdauer bei 38°: 9o min.

Anzahl der Zellen pro mm^3: 94 ooo 4,75 ml Suspension pro Kölbchen

	O_2-Verbrauch µMol/h	%	P	K	Na	Ca	Mg	Milchs.	Brenzt.
			mg%						
Medium	-	-	8,o7	7o,8	336	9,3	2,7	76,o	o,45
Kontrollen	5,95	loo	7,28	77,1	3o6	8,5	2,7	66,o	o,68
TITh	15,4	259	6,84	77,1	3o6	8,4	3,o6	63,o	o,83
DNP	12,9	217	7,19	76,5	3o7	9,o	2,65	66,5	o,68
Tetrac.	12,4	2o8	7,28	75,2	3o7	7,8	3,41	65,8	o,68
Tx-am.	5,18	87	7,28	78,9	3o6	8,2	3,3	65,o	o,53
L-Tx	14,65	246	6,93	73,2	3o8	7,6	3,18	64,o	o,91
D-Tx	13,4	225	7,1	76,2	3o2	8,9	3,12	66,3	o,68

C 4) Anaerobe Inkubation mit anschließender aerober Inkubation nach Präinkubation.

Tabelle 34

Untersuchungen des Mediums

Medium: Ascitesflüssigkeit

Präinkubation: 3,5 Std. bei Zimmertemp. mit Zusätzen 10^{-6} m, anschließend mit Ascitesflüssigkeit mit Glucosezusatz verdünnt

Inkubationsdauer anaerob bei 38°: 6o min.

Anzahl der Zellen pro mm^3: 67 ooo 4,75 ml Suspension pro Kölbchen

	K	Na	Ca	Mg	Milchs.	Glucose
				mg%		
Medium	79	326	9,o5	2,64	71,8	1o6
Kontrollen	97	3o5	8,45	2,45	82,o	0
TITh	1oo	325	9,15	3,29	82,o	0
DNP	97	3o2	8,45	2,71	78,8	0
Tetrac.	1o1	311	9,2	3,42	83,5	0
Tx-am.	1oo	3o5	9,2	3,1	85,o	0
L-Tx	99	3o9	8,65	3,16	81,5	0
D-Tx	97	3o5	8,25	3,29	85,o	0

Inkubationsdauer aerob bei 38°: 9o min.

2,75 ml Suspension pro Kölbchen

	O_2-Verbrauch		K	Milchs.	Brenzt.
	µMol/h	%		mg%	
Kontrollen	17,8	1oo	71	75,5	2,42
TITh	17,95	1o1	7o	71,o	3,48
DNP	17,8	1oo	74	69,o	2,57
Tetrac.	16,9	95	73	65,8	3,27
Tx-am.	15,9	89	73	73,8	2,95
L-Tx	18,2	1o2	75	7o,5	3,18
D-Tx	17,6	99	74	71,o	3,1o

Diskussion

Der Sauerstoffverbrauch aerob inkubierter Diaphragmen normaler oder hypothyreotischer Mäuse unterlag starken Schwankungen, die von dem Tiermaterial abhingen und nicht reproduzierbare Werte lieferten (Tabellen 1, 3, 5, 6, 8, 9, 1o, 15, 16, 21, 22). Weder durch die Veränderung des Mediums noch durch Zugabe von Thyreoidea-Hormonen oder deren Derivaten traten signifikante Unterschiede auf.

Auch die Werte der von den Diaphragmen im Verlauf der Inkubationen gebildeten Milchsäure wiesen große Unterschiede auf. Ein Einfluß des Inkubationsmediums oder von Thyreoidea-Hormon-Zusätzen konnte nicht festgestellt werden. Ein unterschiedliches Verhalten von Diaphragmen normaler oder hypothyreotischer Mäuse war nicht feststellbar (Tabellen 1 - 7, 11 - 13, 15, 17 - 22).

Die Konzentrationen an Brenztraubensäure und Glucose unterlagen ebenfalls großen Schwankungen und lassen keinen Einfluß von Thyreoidea-Hormon-Zusätzen erkennen (Tabellen 5, 6, 11 - 13, 15, 2o).

Weiterhin bestand kein signifikanter Einfluß von Thyreoidea-Hormonen auf die Ionenverschiebungen während der Inkubation von Diaphragmen. Wie die Ergebnisse, die unter Verwendung von ^{45}Ca erhalten wurden, zeigen (Tabellen 21, 22), bestand nach aerober Inkubation von Diaphragmen in Ringer-Glucose-Phosphat-Lösung keine unterschiedliche Verteilung von Calcium in den Zellen und im Medium nach Thyreoidea-Hormon-Zusatz.

Der Ionengehalt der Diaphragmen unterliegt starken Schwankungen, die wahrscheinlich vom Tiermaterial abhängen. Die Diaphragmen enthielten nach der Inkubation nur noch sehr geringe Mengen an Kalium (Tabellen 1 b - 4 b, 19 b - 22 b), da ein Kalium-Verlust während der Inkubation nicht zu vermeiden war.

Durch die Verwendung von ^{32}P konnte der Phosphat-Austausch in Ascites-

flüssigkeit aerob inkubierter Diaphragmen geprüft werden. Es ergab sich, daß nach Zugabe von TITh oder Tetrac. in einer Konzentration von 10^{-7}m ein vermehrter Phosphat-Transport in das Gewebe beobachtet werden konnte, ohne daß der Sauerstoffverbrauch signifikant erhöht war (Tabelle 16). Der vermehrte Phosphat-Austausch kann in Beziehung gesetzt werden zu Untersuchungen von Rawson (2o) an Hunden, in denen bei gleichzeitiger Infusion von Phosphat und TITh, jedoch nicht durch Infusion von Phosphat oder TITh allein eine Erhöhung des Sauerstoffverbrauchs beobachtet werden konnte. Nach der Inkubation von Mäusediaphragmen in anderen Medien ergab sich kein Unterschied im Phosphat-Austausch zwischen Diaphragma-Phosphat und Medium-Phosphat nach Zusatz von Thyreoidea-Hormonen.

Der Sauerstoffverbrauch aerob inkubierter Ascites-Tumorzellen ist abhängig von dem verwendeten Inkubationsmedium. In einem synthetischen Medium wurde weniger Sauerstoff verbraucht als in Ascitesflüssigkeit (Tabellen 26, 27), wobei die Zugabe von Thyreoidea-Hormonen oder deren Derivaten keinen Einfluß hatte.

Bei längerer Inkubationsdauer wurde durch Zusätze von TITh, DNP oder L-Tx eine Steigerung des Sauerstoffverbrauchs der Asciteszellen erzielt, während Tx-amin-Zugabe eine Hemmung bewirkte (Tabelle 28). Durch Präinkubation bei $2o^{o}$ mit Thyreoidea-Hormon-Zusätzen wurde dieser Effekt noch verstärkt (Tabelle 32), besonders ausgeprägt war er bei längerer Präinkubation und anschließender Atmung bei 38^{o} (Tabelle 33).

Dieser erst nach längerer Präinkubation erzielte, signifikante Effekt läßt sich mit den in-vivo-Effekten der Thyreoidea-Hormone vergleichen, die ebenfalls erst nach längerer Latenzzeit auftreten.

Die durchgeführten Inkubationsversuche mit Asciteszellen-Suspensionen erlauben keine Entscheidung, welche Substrate von den Zellen veratmet wurden.

Die Konzentration an Milchsäure, deren Gehalt in der Ascitesflüssigkeit von vornherein Schwankungen aufwies, änderte isch im Verlauf der Inkubation nur wenig (Tabellen 28, 31 - 34).

Glucose war in der Ascitesflüssigkeit nicht nachweisbar und wurde sehr schnell nach Zugabe zur Ascitesflüssigkeit verbraucht (Tabelle 34). Veratmet wurden möglicherweise Lipide oder Aminosäuren, deren Konzentration bei den vorliegenden Untersuchungen nicht bestimmt wurde.

Die Verwendung von Asciteszellen, die in vivo mit ^{32}P markiert waren, erlaubt eine Aussage über den Austausch des Phosphats im Verlauf der aeroben Inkubation in Ascitesflüssigkeit. Nach Zusatz von Thyreoidea-Hormonen in einer Konzentration von 10^{-6}m war der Phosphat-Austausch größer, als wirksam erwiesen sich Zugaben von TITh, Tetrac., Tx-amin, L-Tx und - weniger wirksam - D-Tx, DNP-Zugabe zeigte keinen Effekt (Tabelle 28). Der fehlende Einfluß von DNP auf den Phosphat-Austausch ist besonders auffällig und weist auf eine möglicherweise spezifische Wirkung der Thyreoidea-Hormone oder deren Derivate auf den Phosphat-Stoffwechsel hin.
Nach anaerober Inkubation unter Zusatz von Thyreoidea-Hormonen oder DNP trat nur eine geringe Erhöhung des Phosphat-Austauschs auf (Tabelle 31).

Bei den Untersuchungen an Diaphragmen normaler und hypothyreotischer Mäuse war stets eine Dephosphorylierung im Verlauf der Inkubation zu beobachten, die weder durch die Verwendung von Ringer-Glucose-Phosphat-Lösung allein (Tabellen 1 - 4) oder mit Zusatz von Serumalbumin (Tabelle 9) oder Periston (Tabelle 1o), noch eines Kalium-reichen, aus isotonischen Lösungen zusammengesetzten Mediums (Tabelle 13), Ascitesflüssigkeit (Tabellen 16 - 18) oder Serum (Tabelle 2o) zu verhindern war.
Auch bei der Inkubation von Mäuse-Duodenum oder -Rectum war stets eine Dephosphorylierung zu beobachten (Tabellen 23 - 25). Weiterhin fand stets ein Austritt von Kalium aus dem Gewebe ins Medium statt, auch bei Verwen-

dung sehr Kalium-reicher Medien (Tabelle 11) oder von Serum (Tabellen 19, 2o).

Die Inkubation von Diaphragmen ist mit einem Gewebszerfall verbunden, worauf die stets zu beobachtende aerobe Glycolyse hinweist. Ferner ergibt sich stets ein Austritt von Proteinen, die mit Trichloressigsäure oder Perchlorsäure fällbar sind, in die Inkubationsflüssigkeit.

Die aerobe Inkubation von Asciteszellen in Ascitesflüssigkeit dagegen führte zu keiner Dephosphorylierung (Tabellen 26, 28, 33), nur nach anaerober Inkubation fand sich eine Zunahme des freien Phosphats im Medium (Tabellen 3o, 31).

Auch der Kalium-Gehalt der Ascitesflüssigkeit wies nach der aeroben Inkubation von Asciteszellen keine Erhöhung auf (Tabellen 28, 33, 34), während im Verlauf der anaeroben Inkubation ein Kalium-Austritt aus den Zellen stattfand (Tabellen 29, 31, 34).

Eine morphologische Veränderung der Asciteszellen nach der Inkubation konnte nicht gefunden werden.

Zur Erzielung von signifikanten in-vitro-Effekten sind Bedingungen nötig, die eine intakte Gewebspermeabilität gewährleisten. Die Inkubation von Asciteszellen in Ascitesflüssigkeit findet in einem Milieu statt, dessen Bedingungen denen in vivo zu vergleichen sind, dagegen lassen sich die Ergebnisse, die aus Inkubationsversuchen mit Mäusediaphragmen erhalten wurden, mit in-vivo-Bedingungen nicht ohne weiteres gleichsetzen.

Die bei den vorliegenden Ergebnissen verwendeten Konzentrationen an Thyreoidea-Hormonen - 10^{-7}m oder 10^{-6}m - liegen im Bereich der physiologischen Konzentration oder nur wenig darüber, während die Konzentration bei allen bisherigen Untersuchungen über die Entkopplung der oxydativen Phosphorylierung durch Jodthyronine oder deren Derivate erheblich höher war (ca. 10^{-4}m - 10^{-5}m). Auch bei den bereits angeführten Inkubations-

ansätzen von Pitt-Rivers mit Ascites-Tumorzellen, die eine Erhöhung der aeroben Glycolyse nach Zugabe von Tetrac. und Triac. ergaben, wurden unphysiologisch hohe Konzentrationen von ca. 10^{-4} m benutzt.

Aus den angeführten Untersuchungen ergibt sich, daß bei der Wahl geeigneter Versuchsbedingungen reproduzierbare in-vitro-Effekte von Thyreoidea-Hormonen nachweisbar sind. Diese Untersuchungen erlauben jedoch keine Aussage zum Wirkungsmechanismus der Thyreoidea-Hormone.

Zusammenfassung

Bei der in-vitro-Inkubation von Mäusediaphragmen und Ehrlich-Ascites-Tumorzellen in verschiedenen Medien unter Zusatz von Thyreoidea-Hormonen und Dinitrophenol (DNP) konnten folgende Befunde erzielt werden:

1) Bei allen Inkubationen von Mäusediaphragmen fanden eine Dephosphorylierung und ein Kalium-Austritt aus den Zellen statt.
   Bei der Inkubation von Mäuseduodenum und -rectum fanden ebenfalls eine Dephosphorylierung und ein Kalium-Austritt aus den Zellen statt.
   Bei der Inkubation von Asciteszellen in Ascitesflüssigkeit traten keine Dephosphorylierung und Kalium-Verlust der Zellen auf.
2) Die Inkubation von Mäuse- und Rattendiaphragmen in Serum und synthetischen Medien unter Zusatz von Thyreoidea-Hormonen und deren Derivaten ergab weder eine reproduzierbare Erhöhung des Sauerstoffverbrauchs noch signifikante Veränderungen in der Bildung von Milchsäure oder des Phosphataustauschs zwischen dem Zellphosphat und dem Phosphat des Mediums.
3) Bei der Inkubation von Mäusediaphragmen in Ascitesflüssigkeit unter Zusatz von Thyreoidea-Hormonen und Derivaten konnte ein vermehrter Phosphat-Transport in das Gewebe nach Zugabe von TITh und Tetrac. gezeigt werden, ohne daß der Sauerstoffverbrauch jedoch signifikant erhöht war.
4) Unter dem Einfluß von Thyreoidea-Hormonen wurde die Atmung von Asciteszellen in Ascitesflüssigkeit nach Präinkubation in Ascitesflüssigkeit signifikant erhöht im Gegensatz zu Untersuchungen in synthetischen Medien.
5) Bei der Inkubation von Asciteszellen in Ascitesflüssigkeit unter Zusatz von Thyreoidea-Hormonen ohne Präinkubation konnte durch Verwendung von ^{32}P ein erhöhter Phosphat-Austausch beobachtet werden.

6) Die angeführten Untersuchungen lassen den Schluß zu, daß für in-vitro-Wirkungen eine intakte Zellstruktur notwendig ist, die nur bei der Inkubation von Asciteszellen in Ascitesflüssigkeit erreicht wurde.

Literatur

1) Th. Bersin: Arzneimittelfoschung 7: 19, 133, 185 (1957)

2) Th. Bersin: Biochemie der Hormone, Leipzig 1959, S. 93

3) F. Gudernatsch in Lardy u. Maley: Rec. Prog. Horm. Res. 1o: 153, (1954)

4) H.A. Lardy u. G.F. Maley: Rec. Prog. Horm. Res. 1o: 129 (1954)

5) C. Martius: 3. Intern. Kongr. f. Biochemie Brüssel 1955

6) C. Martius: Angew. Chemie 7o: 82 (1958)

7) R.W. Rawson in Lardy u. Maley: Rec. Prog. Horm. Res. 1o: 147 (1954)

8) A.E. Lehninger u. B.L. Ray: Biochem. Biophys. Acta 26: 643 (1957)

9) Sz. Donhoffer, I. Várnai, E. Sziebert-Horváth: Acta Physiol. Hung. 14: 265 (1958)

1o) O. Thibault u. R. Pitt-Pivers: Lancet I: 285 (1955)

11) M. Heimberg, J.H. Park, A. Isaacs u. R. Pitt-Rivers: Endocrinology 57: 756 (1956)

12) E. Negelein in H.M. Rauen: Biochemisches Taschenbuch, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1956, S. 997

13) Hinsberg-Lang: Medizinische Chemie, München-Berlin-Wien 1957

14) J.B. Martin u. D.M. Doty: Anal. Chem. 21: 965 (1949)

15) H. Weil-Malherbe u. R.H. Green: Biochem. J. 49: 286 (1952)

16) M. Orange u. H.C. Rhein: J. biol. Chem. 189: 379 (1951)

17) H.D. Horn u. F.H. Bruns: Biochem. Biophys. Acta 21: 378 (1956)

18) Th. Bücher u. Mitarbeiter: unveröffentlicht

19) D. Keilin u. E.F. Hartree: Biochem. J. 39: 293 (1945), 42: 23o (1948)

J.D. Teller: Abstr. Amer. Chem.Soc. 13oth Meeting 69 C (1956)

A.St.G. Huggett u. D.A. Nixon: Biochem. J. 66: 12 P (1957), Lancet II: 368 (1957)

2o) K.E. Roberts, G. Firmat, J. Prunier, M.K. Schartz u. R.W. Rawson: Endocrinology 59: 565 (1956)

Lebenslauf

Ich, Barbara Keil, wurde am 18. April 1926 in Berlin als Tochter des Oberveterinärrates Dr. Fritz Keil und seiner Ehefrau Maria, geb. Schöngart, geboren. Von 1932 bis 1936 besuchte ich die 2o. Volksschule in Berlin-Neukölln und ab April 1936 die Oberschule für Mädchen in Berlin-Treptow, an der ich im Februar 1944 die Reifeprüfung mit dem Prädikat "gut" bestand.

Im Sommersemester 1946 begann ich an der Humboldt-Universität Berlin mit dem Studium der Biologie, das ich im Oktober 195o mit der Diplomprüfung für Biologen mit dem Prädikat "sehr gut" abschloß.

Im Sommersemester 1951 und im Wintersemester 1951/52 studierte ich Zoologie an der Freien Universität in Berlin-Dahlem. Vom 15. Januar 1951 bis zum 31. Mai 1953 arbeitete ich außerdem als Chemiepraktikantin im Hauptlaboratorium der Fa. Schering A.G., Berlin, wo ich den ersten Teil der Untersuchungen für meine Doktorarbeit unter Leitung von Prof. Dr. Junkmann durchführte.

Vom Wintersemester 1953/54 bis zum Sommersemester 1955 studierte ich hauptsächlich Biochemie an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen. Neben den Untersuchungen für meine Doktorarbeit unter Leitung von Dozent. D.Ing. G. Hillmann war ich vom 1. November 1955 bis zum 31. Mai 1956 und vom 1. September 1956 bis zum 15. März 196o mit Arbeiten als wissenschaftliche Hilfskraft im Hauptlaboratorium der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen beschäftigt.